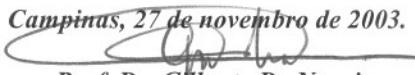


ANA AMÉLIA FALEIROS DE PADUA

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS (COMPRIMIDOS) CONTENDO 20mg DE
LISINOPRIL, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS
DE AMBOS OS SEXOS**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Ana Amélia Faleiros de Pádua.

Campinas, 27 de novembro de 2003.



*Prof. Dr. Gilberto De Nucci
- Orientador -*

CAMPINAS – SP

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

ANA AMÉLIA FALEIROS DE PADUA

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS (COMPRIMIDOS) CONTENDO 20mg DE
LISINOPRIL, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS
DE AMBOS OS SEXOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS – SP

2003

UNIDADE	BC
1ª CHAMADA	UNICAMP
P136e	
/	EX
OMBO, BC/	60629
ROC.	16.07.04
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	17.11.04
Nº CPD	

Silid. 329960

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

P136e Padua, Ana Amélia Faleiros de
 Estudo de bioequivalência entre duas formulações
 farmacêutica (comprimidos) contendo 20mg de Lisinopril, em
 voluntários sadios de ambos os sexos. / Ana Amélia Faleiros de
 Padua. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Gilberto de Nucci
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biodisponibilidade. 2. Farmacocinética. 3. Enalapril. I.
 Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

MEMBROS:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 27/11/2003

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos
meus queridos pais, irmãos, aos meus lindos sobrinhos Henrique e Ana Luiza,
à minha avó Zenaide e ao meu namorado Murilo.*

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Dr. Gilberto de Nucci, pelo crédito, oportunidade e orientação. Deixo aqui minha imensa gratidão, respeito e extrema admiração por sua indiscutível competência.

Agradeço às pessoas que me apresentaram a ele e me apoiaram neste período, que foram os amigos Moisés Vanuncci e Ronilson Moreno.

À Medley, pelos conhecimentos adquiridos, fundamentais para a elaboração deste trabalho. À Dra. Clarice, Dr. Jorge e Jairo, expresso aqui minha sincera gratidão e amizade.

Agradeço ao meu amigo Pedro (ANVISA) pelas valiosas críticas e sugestões.

Aos meus queridos amigos estatísticos Amarante, Leão e Gercilei, que muito contribuíram para meu conhecimento estatístico na área.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram deste estudo de bioequivalência.

Agradeço também aos professores participantes da banca examinadora: Dra. Pierina, Dr. Ronilson, Dra. Valentina Porta e Dra. Vera Lanchote.

"Ao regulamentar e fazer cumprir a Lei dos Genéricos o ministério busca tornar mais acessível ao cidadão um tratamento médico de boa qualidade, sem o qual qualquer outro esforço no sentido de bem assistir à saúde da população pode ficar comprometido".

Gonzalo Vecina Neto

Diretor-presidente da ANVISA (1999-2002)

Resumo	xxvii
Abstract	xxxix
1. INTRODUÇÃO	33
1.1. Conceitos gerais sobre o tema.....	35
1.2. Biodisponibilidade Relativa: inferência da equivalência terapêutica	36
1.3. Importância da realização do estudo de bioequivalência.....	37
1.4. Aspectos regulatórios da vigilância sanitária dos medicamentos genéricos no Brasil e seu impacto na saúde pública.....	40
1.5. Fator econômico	43
1.6. Dados gerais do Lisinopril	43
1.6.1. Farmacocinética	43
1.6.2. Farmacodinâmica	45
1.6.3. Indicação terapêutica.....	46
1.6.4. Relação dose-efeito	46
1.6.5. Esquema terapêutico	47
1.6.6. Sumário dos riscos potenciais para seres humanos	47
2. OBJETIVO	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1. Casuística	55
3.2. Etapa clínica	55
3.3. Etapa analítica	56
3.3.1. Materiais	56
3.3.2. Equipamentos.....	57
3.3.3. Substâncias Padrões.....	57
3.3.4. Reagentes	58
3.3.5. Espécies biológicas	58
3.3.6. Soluções utilizadas no ensaio.....	58
3.3.7. Quantificação das amostras.....	59
3.3.7.1. Curvas de calibração	59
3.3.7.2. Controles de qualidade (CQ)	60

3.3.7.3. Critérios de aceitação ou rejeição da corrida analítica (validação da corrida analítica).....	61
3.3.7.4. Extração das amostras	61
3.3.7.5. HPLC/MS/MS	62
3.3.8. Validação do método analítico empregado	63
3.3.9. Testes de Estabilidade do fármaco nas condições experimentais	66
3.4. Etapa estatística	67
4. RESULTADOS	69
4.1. Validação do Método Analítico	71
4.2. Testes de estabilidade	78
4.3. Etapa clínica	80
4.4. Curva de concentração plasmática versus tempo dos voluntários, para as duas formulações.....	83
4.5. Análise descritiva do parâmetro C_{max}	112
4.6. Análise descritiva do parâmetro ASC_{0-t}	113
4.7. Análise do t_{max}	114
4.8. Intervalo de Confiança de 90 % pela BE média	114
5. DISCUSSÃO	115
5.1. Metodologia analítica empregada	117
5.2. Etapa clínica e estatística.....	120
6. CONCLUSÃO	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS	143
APÊNDICE I	157
APÊNDICE II	169

Figura 1: Níveis plasmáticos médios de fenacetina, em voluntários sadios, após administração de comprimidos, de doses idênticas, fabricados com lotes de fenacetina com diâmetros médios de partícula distintos.....	38
Figura 2: Níveis plasmáticos médios de cloranfenicol, em voluntários sadios, após administração de dose iguais de suspensões que continham diferentes proporções dos polimorfos α e β	39
Figura 3: Proposta de fragmentação da molécula lisinopril.....	63
Figura 4: Proposta de fragmentação da molécula de enalaprilato.....	63
Figura 5: Cromatogramas de amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado.....	72
Figura 6: Cromatograma do LQ.....	73
Figura 7: Curva de calibração.....	74
Figura 8: Cromatogramas de amostras zero (branco + padrão interno), amostras QCA (3 ng/ml +Padrão Interno), amostras de QCB (30 ng/ml + Padrão Interno) e de amostras de QCC (150 ng/ml + Padrão Interno).	75/76/77
Figura 9: C _{max} por voluntários nas formulações R e T.....	112
Figura 10: ASC _{0-t} por voluntários nas formulações R e T.....	113
Figura 11: Comparação gráfica entre R e T, considerando o parâmetro t _{max}	114

Tabela 1: Análise descritiva dos voluntários	81
Tabela 2: ANOVA para $\ln(C_{\max})$ – tipo 3.....	112
Tabela 3: ANOVA para $\ln(ASC_{0-t})$ – tipo 3.....	113
Tabela 4: Intervalo de Confiança de 90 % para os parâmetros C_{\max} e ASC_{0-t} , pelo critério de Bioequivalência Média	114
Tabela 5: Concentrações plasmáticas individuais do medicamento de referência Zestril®	159
Tabela 6: Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento de referência (R) nos 26 voluntários	160
Tabela 7: Concentrações plasmáticas individuais do medicamento teste Lisinopril (ng/ml)	161
Tabela 8: Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento teste (T) nos 26 voluntários	162
Tabela 9: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos após administração do medicamento de referência	163
Tabela 10: Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento referência	164
Tabela 11: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos após administração do medicamento teste	165
Tabela 12: Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento teste	166
Tabela 13: Razão das áreas ASC_{0-t} e ASC_{inf} para o medicamento referência	167
Tabela 14: Razão das áreas ASC_{0-t} e ASC_{inf} para o medicamento teste.....	168

Lista de Quadros

Quadro 1: Preparação das soluções padrão da curva de calibração	60
Quadro 2: Preparação das amostras de controle de qualidade de lisinopril.....	60
Quadro 3: Validação do LOQ.....	72
Quadro 4: Dados de validação da curva de calibração	73
Quadro 5: Precisão e Exatidão intra corrida analítica	74
Quadro 6: Precisão e Exatidão inter corrida analítica	75
Quadro 7: Resultados do teste de recuperação.....	77
Quadro 8: Resultados analíticos dos testes de estabilidade no auto injetor.....	78
Quadro 9: Resultados analíticos dos testes de estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento	78
Quadro 10: Resultados dos testes de estabilidade de curta duração, após 6 horas à temperatura ambiente.	79
Quadro 11: Resultados dos testes de estabilidade de longa duração.....	79
Quadro 12: Resultados analíticos dos testes de estabilidade das soluções padrão	80
Quadro 13: Reações adversas ocorridas durante o estudo	82

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	análise de variância;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ASC_(0-t)	área sob a curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação (LOQ), calculada pelo método linear-log trapezoidal. Neste estudo, está expressa em ng/mlxh;
ASC_{0-inf}	área sob a curva obtida a partir da concentração do fármaco <i>versus</i> do tempo 0 (zero) ao tempo extrapolado ao infinito, calculada pelo método linear-log trapezoidal $AUC_{(0-t)} + C_t/k_e$, onde C_t é a última concentração quantificável. Neste estudo, está expressa em ng/mlxh;
ASC_{0-tlast} (pareada)	área sob a curva obtida a partir da concentração do fármaco <i>versus</i> tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação (LOQ) comum aos dois períodos, calculada pelo método linear-log trapezoidal;
ASC_{0-inf} (%) - extrapolado	percentagem da área extrapolada ao infinito;
ASC₀₋₄₈ — linear	área sob a curva do tempo 0 (zero) ao tempo de coleta 48 horas, calculado pelo método linear;
BE	bioequivalência;
HPLC/MS/MS	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas;
C_{max}	maior concentração alcançada, com base nos dados experimentais. Neste estudo, está expressa em ng/ml;
C_t	última concentração plasmática do fármaco determinada experimentalmente. Neste estudo, está expressa em ng/ml;

E.C.A.	enzima conversora de angiotensina;
EMA	<i>european medicinal products evaluation of medicines for human use agency;</i>
FDA	<i>food and drug administration;</i>
I.C.	intervalo de confiança;
K_e	constante de velocidade de eliminação de primeira ordem, estimada pela inclinação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados do tempo x logaritmo da concentração. Expressa em 1/h;
LQ	limite de quantificação;
MRM	monitoramento de reações múltiplas;
m/z	relação massa/carga;
T_{1/2}	meia-vida de eliminação, calculada com $\ln(2)/k_e$;
T_{max}	tempo correspondente à C _{max} ;
T_{pareado}	tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação (LQ), comum aos dois períodos;
TGI	trato gastrointestinal.

Este estudo teve por objetivo avaliar a bioequivalência entre duas formulações farmacêuticas contendo a substância ativa lisinopril, em termos de velocidade (C_{max}) e extensão de absorção (ASC_{0-t}) do ativo no organismo. O medicamento teste foi o Lisinopril comprimido de 20 mg da Medley S.A. Indústria Farmacêutica (lote LIC 06/01-1; validade: junho/03) e o medicamento de referência foi o Zestril® comprimido de 20 mg, produzido pela Astra Zeneca (lote A03534; validade: outubro/04). O estudo de bioequivalência foi do tipo aberto, aleatório, cruzado, dois períodos e duas seqüências, em 26 voluntários sadios de ambos os sexos (balanceado), dose única (20 mg) e em jejum. O intervalo entre as internações foi de 2 semanas. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 1h, 2h, 3h, 3h30min, 4h, 4h30min, 5h, 5h30min, 6h, 6h30min, 7h, 7h30min, 8h, 8h30min, 9h, 10h, 12h, 24h e 48h. As amostras coletadas, foram imediatamente centrifugadas, e os plasmas foram separados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior quantificação. No geral, as formulações foram bem toleradas e apenas cinco voluntários se queixaram de cefaléia. Não houve desistência ou retirada de voluntários. As concentrações plasmáticas totais de lisinopril foram determinadas por um método devidamente validado, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS/MS). A fonte de ionização foi *electrospray* operando no modo positivo (ES+) com monitorização de reações múltiplas (MRM). O limite de quantificação do método foi de 2 ng/ml, com precisão de 8,9 % ($n=8$) e exatidão de 98,9 % ($n=8$). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 6,5 min. e os tempos de retenção dos analitos foram próximos de 4,0 min. A faixa de linearidade validada foi de 2,00 – 200 ng/ml. A recuperação média do método de extração para o lisinopril foi de $79,2 \pm 5,9\%$, $80,3 \pm 3,4\%$ e $82,5 \pm 3,9\%$ (3,00; 30,0 e 150 ng/ml, respectivamente), e para o padrão interno enalaprilato foi de $77,7 \pm 7,2\%$ (250 ng/ml). Após transformação logarítmica das concentrações plasmáticas encontradas experimentalmente, foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos utilizados no cálculo de bioequivalência: C_{max} (concentração plasmática máxima) e ASC_{0-t} (área sob a curva de zero ao último tempo de coleta). Foi feita a análise de variância (ANOVA) para avaliar os efeitos de período, seqüência, tratamento e voluntário dentro da seqüência para os valores de C_{max} e ASC_{0-t} . Pela ANOVA, somente o efeito do voluntário dentro da seqüência foi significativo, para os dois parâmetros avaliados, evidenciando a variabilidade inter individual. O intervalo de

confiança com os limites extremos de aceitação da bioequivalência baseou-se em dois testes *t* unicaudais, com nível de significância de 5 %, utilizando o quadrado médio residual da ANOVA. Todos os voluntários foram considerados no cálculo. A média geométrica e o intervalo de confiança de 90 % para as razões das médias geométricas entre o medicamento teste e medicamento referência, para os parâmetros ASC_{0-t} e C_{max} , foram de 95,5% (85,0 – 107,4 %) e 92,6 % (81,7 – 105,1 %), respectivamente. Uma vez que os resultados obtidos no estudo estão compreendidos no intervalo de confiança aceito pela ANVISA (80 a 125 %), conclui-se que as duas formulações em estudo são bioequivalentes, em termos de velocidade e extensão de absorção do ativo no organismo.

The aim of this study was to evaluate the bioequivalence between two formulations of lisinopril 20 mg. The test formulation was Lisinopril tablet 20 mg, manufactured by Medley S/A Indústria Farmacêutica (lot # LIC 06/01-1; expiry date: june/03) and the reference formulation was Zestril® tablet 20 mg, manufactured by Astra Zeneca (lot # A03534; expiry date: october/04). The bioequivalence study design was an open, randomized, two-period crossover (2-sequence), with a 2-week washout interval, in 26 healthy volunteers, both sexes (balanced), single dose (20 mg), in fasting conditions. The blood samples collecting were 0, 1h, 2h, 3h, 3h30min, 4h, 4h30min, 5h, 5h30min, 6h, 6h30min, 7h, 7h30min, 8h, 8h30min, 9h, 10h, 12h, 24h e 48h. The total plasma concentrations were quantified by a validated method, using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS), with electrospray ionization running in positive mode (ES+) and Multiple Reaction Monitoring (MRM). The limit of quantification (LOQ) was 2 ng/ml. The precision and accuracy, calculated from LOQ samples (n=8) were 8.9 % and 98.9 % respectively. The method had a chromatographic total run time of 6.5 min. and was linear within the range 2.00 – 200 ng/ml. The mean recoveries observed (n=5) for lisinopril were 79.2 ± 5.9 %, 80.3 ± 3.4 % and 82.5 ± 3.9 % (3.00, 30.0 and 150 ng/ml, respectively). The mean recoveries observed (n=5) for enalaprilat were 77.7 ± 7.2 %. From the log-transformation of the plasma concentrations values were obtained the pharmacokinetics parameters for the bioequivalence calculation: C_{max} (absorption rate) and AUC_{0-t} (absorption extension). It was evaluated by ANOVA the effects of period, sequence, product and subject in the sequence for C_{max} and AUC_{0-t} . Only the subject in the sequence was considered statistically significant, showing the presence of significative interindividual variability. The 90 % confidence interval was based on the residual variance of ANOVA. The geometric mean and the 90 % CI test/reference ratios were 95.5 % (85.0 – 107.4 %) for AUC_{last} and 92.6 % (81.7 – 105.1 %) for C_{max} . Since the 90 % CI for AUC_{last} and C_{max} ratios are within the 80-125 % interval proposed by the ANVISA, it concludes that Lisinopril 20 mg tablet (test formulation) is bioequivalent to Zestril® 20 mg tablet, in terms of both rate and extent of absorption.

1.1. Conceitos gerais sobre o tema

O estudo de bioequivalência consiste na comparação entre as biodisponibilidades de formulações farmacêuticas. O termo biodisponibilidade é considerado como sendo a velocidade e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no seu sítio de ação da droga. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo do medicamento em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (METZLER, 1974).

A bioequivalência entre duas ou mais formulações também pode ser avaliada através de parâmetros farmacodinâmicos (STORPIRTIS, 1999).

Os parâmetros farmacocinéticos avaliados em estudos de bioequivalência são aqueles relacionados ao processo de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica administrada (STORPIRTIS, 1999).

Esses parâmetros relacionam-se à quantidade de fármaco absorvida, bem como à velocidade pela qual este processo ocorre. A quantidade de fármaco absorvida (ou exposição do fármaco no organismo) é obtida através do valor da área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta (ASC_{0-t}). A velocidade de absorção é avaliada pela medida pontual da maior concentração plasmática do fármaco atingida experimentalmente (C_{max}) após a administração do medicamento. O parâmetro t_{max} , é o tempo relacionado à C_{max} , também avaliado em estudos de bioequivalência, quando clinicamente relevante (BRASIL, 2003).

Conforme definido na Resolução RDC nº 135, de 2 de junho de 2003, medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade.

Equivalentes farmacêuticos são medicamentos que contêm o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma

quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos (BRASIL, 2003).

O medicamento genérico, no Brasil, é definido com equivalente farmacêutico em relação ao medicamento de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB ou, na sua ausência, pela DCI (BRASIL, 1999).

A eficácia e segurança do medicamento genérico em relação ao medicamento de referência, na maioria dos casos, são asseguradas através de estudos de bioequivalência. Em alguns casos, a bioequivalência pode ser comprovada por estudos *in vitro*, como é o caso dos produtos de uso tópico sem absorção sistêmica.

O medicamento de referência é o medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no Brasil, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro (BRASIL, 1999). O medicamento inovador é aquele medicamento comercializado nacionalmente, composto por, pelo menos, um fármaco ativo, sendo que esse fármaco deve ter sido objeto de patente, mesmo já extinta, por parte da empresa responsável por seu desenvolvimento e introdução no mercado do país de origem. Em geral, o medicamento inovador é considerado medicamento de referência, entretanto, na sua ausência, a ANVISA indica o medicamento de referência (BRASIL, 1999).

1.2. Biodisponibilidade Relativa: inferência da equivalência terapêutica

Era assumido que equivalentes farmacêuticos eram necessariamente equivalentes terapêuticos. São considerados equivalentes farmacêuticos os produtos que possuem entre si a mesma concentração da substância ativa, na mesma forma farmacêutica, porém, não necessariamente os mesmos excipientes, processo de fabricação, local de fabricação, etc, e não possuem estudo de biodisponibilidade ou qualquer outro estudo clínico comparativo. Por outro lado, um produto farmacêutico é terapeuticamente equivalente a outro se este contiver a mesma substância ativa ou mistura terapêutica e, clinicamente, demonstre que possui mesma eficácia e segurança

com este produto de eficácia e segurança estabelecida através de ensaios clínicos (METZLER, 1974).

Porém, foi demonstrado que a hipótese de que equivalentes farmacêuticos eram terapeuticamente semelhantes estava totalmente equivocada para inúmeros fármacos. Assim, o interesse em estudos clínicos que garantissem a segurança clínica e eficácia dos medicamentos era cada vez maior. Entretanto, ensaios clínicos de eficácia são difíceis e caros. Neste caso, o produto deve mostrar o mesmo efeito terapêutico na situação clínica. Diante deste obstáculo, o estudo de biodisponibilidade comparativo foi instituído na prática médica como uma tentativa de inferir a equivalência terapêutica sem a necessidade de estudos clínicos de eficácia e segurança. Esta extrapolação fundamenta-se no fato de que, uma vez que a substância ativa, encontra-se na corrente sanguínea, os mecanismos farmacocinéticos posteriores (distribuição, metabolismo e excreção) não serão influenciados pela formulação e o fármaco absorvido, a partir das respectivas formas farmacêuticas, comporta-se indistintamente, exercendo o mesmo efeito terapêutico (METZLER, 1974). Da mesma forma, uma vez que o medicamento de referência, através de estudos de toxicidade pré clínicos e estudos clínicos, comprova a eficácia e segurança da substância ativa liberada da sua forma farmacêutica final, entende-se que, se o medicamento, candidato a genérico, apresentar a biodisponibilidade próxima (bioequivalência) à do medicamento de referência, ou seja, dentro da faixa terapêutica, este também pode assumir que é um medicamento seguro e eficaz, e, conseqüentemente, intercambiável com o medicamento de referência (TOZER & ROWLAND, 1995).

1.3. Importância da realização do estudo de bioequivalência

Muitos erros terapêuticos relacionados à diferenças na biodisponibilidade, ocorridos no passado, justificam a necessidade de testes do desempenho da forma farmacêutica em liberar a substância ativa na circulação sistêmica e, dessa forma, no sítio de ação. Além disso, a biodisponibilidade da substância ativa a partir de um produto farmacêutico deve ser conhecida e reprodutível (STORPIRTIS, 1999).

A biodisponibilidade de uma formulação farmacêutica pode ser influenciada por dois fatores (SHARGEL & YU, 1993) (STORPIRTIS, 1999):

1. Fatores relacionados ao indivíduo: idade, sexo, peso corporal e fatores fisiológicos associados.
2. Fatores relacionados à forma farmacêutica (fármaco, excipientes e técnica de fabricação): tamanho de partícula, forma polimórfica, presença de solvato ou hidrato, natureza química, solubilidade, tipo e quantidade de excipientes, método de preparação, tipo de granulação, tempo de mistura ou agitação, condições de secagem, velocidade de compressão e instabilidade.

A importância da realização de ensaios de bioequivalência para verificação da equivalência terapêutica entre formulações farmacêuticas é facilmente elucidada por alguns exemplos, mostrados através das figuras 1 e 2, a seguir, que comprovam a influência dos fatores relacionados à forma farmacêutica na biodisponibilidade do fármaco, o que pode resultar em diferenças clinicamente significativas de eficácia e segurança entre medicamentos com a mesma indicação terapêutica e mesmo regime de dosagem, que não possuem testes clínicos comparativos (STORPIRTIS, 1999).

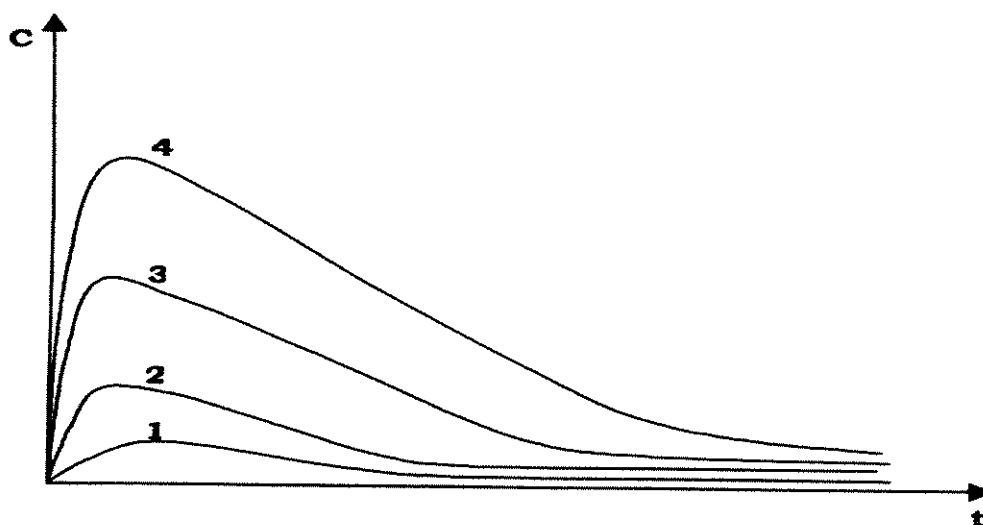


Figura 1: Níveis plasmáticos médios de fenacetina, em voluntários sadios, após administração de comprimidos de doses idênticas fabricados com lotes de fenacetina com diâmetros médios de partícula distintos (1 - $>250\mu$; 2 - 165μ ; 3 - $<75\mu$; 4 - $<75\mu + 0,1\% T_{\text{ween}} 80$).

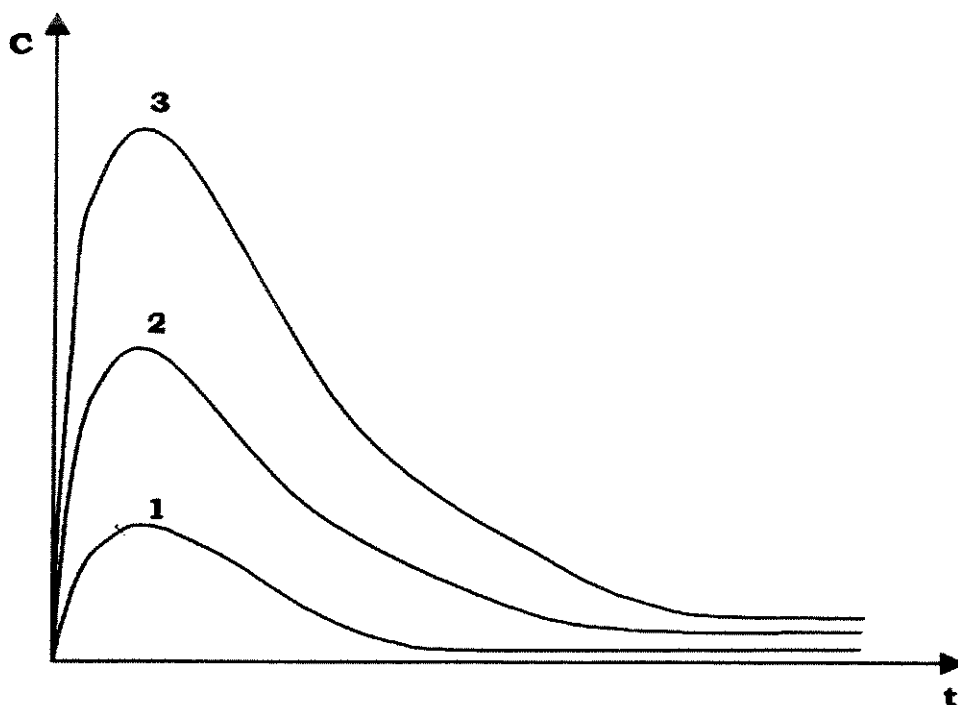


Figura 2: Níveis plasmáticos médios de cloranfenicol, em voluntários sadios, após administração de doses iguais de suspensões que continham diferentes proporções dos polimorfos α e β (1 – 0% β e 100% α ; 2 – 50% β e 50% α ; 3 – 100% β e 0% α).

Discute-se sobre a substituição do ensaio de bioequivalência por perfis de dissolução comparativos.

O estudo da dissolução de fármacos é utilizado para verificar a velocidade pela qual o fármaco é liberado e solubilizado, nas condições experimentais definidas (pH, agitação, temperatura), em intervalos de tempo pré – estabelecidos.

A absorção do fármaco não consiste apenas da etapa de dissolução, depende também da permeabilidade do mesmo na mucosa gastrointestinal. Esta última característica não é avaliada em um estudo de dissolução *in vitro*. A questão é ainda mais crítica para fármacos onde o fator limitante da absorção é a permeabilidade, como é o caso do lisinopril. Além disso, estudos de permeabilidade *in vitro* de fármacos ainda são limitados e a maioria deles baseia-se na sua biodisponibilidade *in vivo*.

Seguem abaixo, algumas das limitações do perfil de dissolução como ferramenta para prever o desempenho do medicamento *in vivo*:

- os tampões utilizados como meios de dissolução nos estudos de perfis de dissolução não são fiéis em relação à reprodutibilidade das condições do trato gastrointestinal (TGI) *in vivo*. Fatores relevantes a considerar são: pH, enzimas digestivas, variabilidade interindividual, presença de alimentos, cada local do TGI possui um pH diferente (impossível de reproduzir *in vitro*) etc.
- não analisa a permeabilidade do fármaco na mucosa gastrointestinal.
- não reproduz os movimentos peristálticos.
- Não considera variabilidade intra e interindividual.

Existem, na prática, vários exemplos de formulações com perfis de dissolução semelhantes, que são bioinequivalentes.

1.4 Aspectos regulatórios da vigilância sanitária dos medicamentos genéricos no Brasil e seu impacto na saúde pública

A lei “mãe” que rege a vigilância sanitária sobre os medicamentos, correlatos, insumos farmacêuticos, entre outros, é a Lei nº 6.360, criada em 23 de setembro de 1976, já com alterações em alguns de seus artigos. No ano de 1993, foi publicado no Diário Oficial da União (D.O.U.) o Decreto nº 793, onde instituiu o nome genérico na embalagem. Este Decreto, embora não fosse um regulamento técnico, foi o que primeiro levantou a questão de testes de biodisponibilidade e bioequivalência no Brasil, até então ignorada. Em 1996, através da Lei nº 9.276, foi estabelecida proteção patentária para medicamentos inovadores. Em 1999, com a Lei nº 9.787, foi instituído no País o medicamento genérico, regulamentado através da Resolução nº 391, de agosto de 1999. Esta resolução já sofreu três atualizações. A primeira ocorreu em 2001, através da publicação da Resolução RDC nº10. A segunda atualização foi em 2002, pela publicação da Resolução RDC nº 84. E a terceira e última atualização ocorreu em 2 de junho de 2003, através da Resolução RDC nº 135.

Paralelamente à implantação da Lei dos Genéricos no Brasil, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Lei nº 9.782, em 26 de janeiro de 1999, na época denominada ANVS. Trata-se de uma autarquia, sob regime especial, ou seja, uma agência reguladora caracterizada pela independência administrativa,

estabilidade de seus dirigentes durante o período de mandato e autonomia financeira. O novo órgão incorporou as competências da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, adicionadas a novas missões: coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), monitoramento de preços de medicamentos, controle de propaganda de produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária, entre outros. Tem como missão proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso. A Agência está vinculada ao Ministério da Saúde, fornecendo relatórios periódicos de desempenho.

Sendo assim, anteriormente ao medicamento genérico, o que se tinha no Brasil eram medicamentos inovadores sem proteção patentária (anteriores a 1996), medicamentos inovadores com proteção patentária (após 1996) e medicamentos comercializados por simples similaridade (com ou sem marca). Estes últimos, em um passado remoto, para terem a concessão do registro junto ao Ministério da Saúde e serem comercializados, fazia-se necessário apenas a apresentação de relatório técnico relativamente simples, regido pelos requerimentos estabelecidos na Instrução Normativa nº 1/97. Enquanto que, o dossiê a ser apresentado ao Ministério da Saúde para a obtenção do registro de medicamento genérico era e ainda é composto por rigorosos testes de qualidade como os testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência, apresentação de certificado de boas práticas de fabricação e controle de qualidade da empresa, entre outros. Dessa forma, até a publicação da Resolução RDC nº133, em 2 de junho de 2003, os medicamentos genéricos apresentavam, sem dúvida alguma, maior controle sanitário por parte do Órgão Regulador, quando comparados aos medicamentos similares. Dessa forma, fazia-se necessário colaborar com a população no sentido de saber identificar o medicamento genérico na farmácia. Assim, através da Resolução nº 36/01, foi concedido um prazo de 6 meses para cessar a comercialização dos similares comercializados com denominação genérica. Caso a empresa tivesse interesse em manter estes medicamentos similares no mercado, era obrigatória a inclusão de marca ou nome comercial. Adicionalmente, outra estratégia utilizada pelo governo para distinção na farmácia entre medicamentos similares e genéricos foi a instituição da tarja amarela na embalagem externa dos medicamentos genéricos. Esta medida foi oficializada através da Resolução nº 47/01. Inevitavelmente, em 2 de junho de 2003, foi publicada a nova regulamentação para os medicamentos similares, a Resolução nº 133/03. Esta, estabelece, entre outros requerimentos semelhantes aos dos medicamentos genéricos,

estudos de equivalência farmacêutica e/ou biodisponibilidade relativa com o medicamento de referência aprovado pela ANVISA.

Em suma, o que pode-se observar nitidamente é o fato de que os medicamentos genéricos, se não trouxeram ao Brasil a obrigatoriedade de testes mais rigorosos de qualidade para os medicamentos em geral, especialmente similares, acelerou este processo e a sociedade se beneficiou muito com este rigor sanitário. Além da qualidade, cada vez mais exigida e fiscalizada, por parte do Órgão Regulador Competente, sem dúvida alguma, outro benefício importante para a sociedade foi a queda de preço dos medicamentos em geral. O medicamento genérico tem que ser, obrigatoriamente, mais barato do que o medicamento referência, para a concessão de seu registro. Os medicamentos inovadores e mesmo os medicamentos similares, sob pressão desta forte concorrência, de maneira geral, tiveram seus preços diminuídos.

Adicionalmente, a vinda dos medicamentos genéricos no Brasil, gerou crescimento substancial das indústrias nacionais, bem como despertou interesse, por parte das indústrias internacionais, no mercado brasileiro e, com isto, a geração de empregos neste setor. Deve-se considerar ainda, o grande investimento na qualificação profissional, sendo necessárias hoje, pessoas cada vez mais especializadas e bem preparadas, capazes de atender às novas regulamentações.

Em relação à legislação brasileira referente a estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, o que pode ser observado é que foi essencialmente embasada nas regulamentações internacionais, como FDA e EMEA. Países onde a política de genéricos já está consolidada. O FDA iniciou a aprovação de medicamentos genéricos sem evidências clínicas de segurança ou eficácia, desde que o fármaco fosse bioequivalente ao produto inovador em 1984 (há quase 20 anos atrás).

É inquestionável, conforme relatado acima, os inúmeros benefícios que os genéricos trouxeram. Entretanto, a finalidade principal do governo ao instituí-los era o aumento do acesso de medicamentos à população, e, este, não foi plenamente atingido. Hoje, apesar dos medicamentos estarem com seus preços diminuídos e controlados pelo Governo, a redução ocorrida na prática não foi suficiente para que a população mais carente, alvo principal desta política, sem acesso a medicamentos, pudesse vir a adquirir esta medicação, devido à manutenção da baixa renda. Ou seja, a população que se beneficia é aquela que já adquiria a medicação de marca, e hoje tem a opção de adquirir

uma medicação de qualidade e segurança comparáveis à anteriormente administrada, por um custo menor. Assim, o genérico é apenas uma pequena ação do Governo que deve ser acompanhada por inúmeras outras, para alcançar o impacto social desejado. Porém, pode-se considerar que este processo já foi iniciado.

1.5. Fator econômico

Existem vários medicamentos genéricos de lisinopril comprimidos de 20 mg disponíveis no mercado, onde o preço varia de 33.24 a 43.01 reais. Já o medicamento de referência custa 73.61 reais. Estes valores foram extraídos da revista ABCFarma de 09/2003 e correspondem à embalagem com 30 comprimidos.

As formulações de lisinopril têm a conveniência da dose única diária, sendo assim, a substituição do medicamento referência pelo medicamento genérico permite ao paciente uma economia de aproximadamente 30 a 40 reais mensais. Para alguns casos onde são necessárias duas doses diárias, esta economia duplica. Geralmente o lisinopril é administrado com outros fármacos, como por exemplo, os diuréticos, o que encarece ainda mais o tratamento.

1.6. Dados gerais do Lisinopril

Lisinopril foi o terceiro fármaco inibidor da ECA (enzima conversora de angiotensina) aprovado nos Estados Unidos, posteriormente ao captopril e enalapril (JACKSON, 2002).

1.6.1. Farmacocinética:

O lisinopril é absorvido lentamente após a administração oral e seu pico de concentração plasmática é atingido entre 6 a 8 horas após dose única, porém, em pacientes com infarto agudo do miocárdio este valor é mais tardio (LANCASTER & TODD, 1988; TILL et al, 1989; ULM et al, 1982). Em voluntários saudáveis, o pico de concentração plasmática máxima ocorreu cerca de 6 horas após administração de 10 ou 20 mg e concentrações detectáveis ainda foram encontradas após 72 a 96 horas (BEERMAN et al,

1986; BIOLLAZ et al, 1982; LEES & REID, 1988; MILLAR et al, 1982; MOJAVERIAN et al, 1986; ULM et al, 1982). Valores médios das concentrações plasmáticas máximas encontradas foram aproximadamente 40 ng/mL, após dose única oral de 10 mg (BIOLLAZ et al, 1982; MILLAR et al, 1982; ULM et al, 1982) e cerca de 80 a 140 ng/mL após dose única oral de 20mg (LEES & REID, 1988; MOJAVERIAN et al, 1986).

Baseado na recuperação urinária do fármaco inalterado, 29% da dose administrada de 10 mg, foi disponível sistemicamente em 12 voluntários sadios (ULM et al, 1982). Similarmente, a biodisponibilidade de uma dose oral de 10 mg de lisinopril foi 25% da mesma dose administrada intravenosamente, em 12 voluntários sadios (BEERMAN et al, 1986). Entretanto, em um estudo com 12 voluntários sadios que receberam uma dose oral de 20 mg, a biodisponibilidade foi de 50 % (LEES & REID, 1988). A biodisponibilidade, após dose oral única de 20 mg, de lisinopril foi similar entre voluntários em jejum e aqueles que receberam alimentação, em um estudo cruzado com 18 voluntários sadios (MOJAVERIAN et al, 1986).

Lisinopril não liga-se a proteínas plasmáticas (GOMEZ et al, 1987). Segundo estudo realizado por AJAI et al (1985), após dose única oral de 20 mg, em 19 voluntários sadios, o volume aparente de distribuição médio (V_d/F) foi de 124 L. Estudos em ratos indicaram que lisinopril atravessa a barreira hematoencefálica em níveis baixos. Doses múltiplas administradas em ratos não resultaram em acúmulo nos tecidos. Não há informação sobre a presença de lisinopril no leite materno (USP DI, 1992).

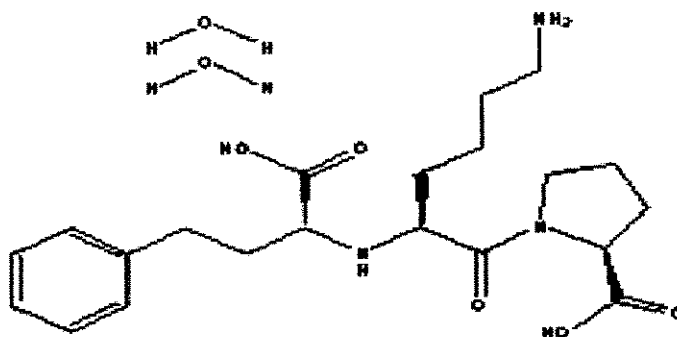
Segundo estudo realizado em voluntários sadios por ULM et al (1982), 97 % da dose de 10 mg foram recuperadas na urina e fezes. A depuração plasmática média do lisinopril, após administração de uma dose de 10 mg, em 12 voluntários, foi de 6,36 L/h (ULM et al, 1982).

A eliminação plasmática de lisinopril é polifásica. A meia vida de eliminação do lisinopril é de 12,6 h e atinge concentrações de equilíbrio em três dias após dose única (BEERMAN et al, 1986). Pacientes idosos, em geral, apresenta picos plasmáticos e a ASC superiores em relação a pacientes jovens (CIRILLO et al, 1986; GAUTAM et al, 1987). Com um grande prejuízo da função renal, o pico e níveis plasmáticos do fármaco aumentam, tempo para atingir este pico e o tempo para atingir o estado de equilíbrio é prolongado (BEGG et al, 1989). Estudos em ratos indicaram que lisinopril atravessa a barreira hematoencefálica em níveis baixos. Doses múltiplas administradas em ratos não

resultaram em acúmulo nos tecidos. Não há informação sobre a presença de lisinopril no leite materno (USP DI, 1992). Não foi observada a interferência do sexo na farmacocinética do fármaco (CAMPOS, 1996).

1.6.2. Farmacodinâmica:

O lisinopril é uma lisina, derivada do enalaprilato (metabólito ativo do enalapril), porém, ao contrário do enalaprilato, não requer hidrólise para se tornar ativo (JACKSON, 2002). Segue abaixo a fórmula estrutural.



Lisinopril, antagonista competitivo da ECA (enzima conversora de angiotensina), atua no sistema renina-angiotensina. A renina é uma enzima que age no angiotensinogênio (seu substrato) para catalisar a formação do decapeptídeo angiotensina 1. Esta, por sua vez, é clivada pela ECA, formando o octapeptídeo angiotensina 2, que é o agente vasoconstritor, grande responsável pelo aumento da pressão arterial. A angiotensina 2 estimula também a secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal. A inibição da ECA resulta em concentrações diminuídas de angiotensina 2, as quais resultam em diminuição da atividade vasopressora e redução da secreção de aldosterona. A diminuição de aldosterona pode resultar em um aumento da concentração sérica de potássio. Acredita-se que o mecanismo pelo qual o lisinopril diminui a pressão arterial é principalmente através da supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Apesar disso, o lisinopril tem demonstrado ser antihipertensivo mesmo em pacientes hipertensos com baixa concentração de renina. A ECA é idêntica à cininase II, enzima que degrada a bradicinina. Ainda não está elucidado se níveis aumentados de

bradicinina, um potente peptídeo vasodilatador, exercem papel importante sobre os efeitos terapêuticos do lisinopril. (JACKSON, 2002; DOUGLAS et al, 1985).

1.6.3. Indicação terapêutica

Indicado para o tratamento da hipertensão essencial e renovascular (POLL et al, 1987; BOLZANO et al, 1987; MORLIN et al, 1987). Pode ser usado como monoterapia ou associado a outras classes de agentes antihipertensivos. O medicamento contendo lisinopril também é indicado para o controle da insuficiência cardíaca congestiva, como tratamento adjuvante com diuréticos e, onde apropriado, digitálicos (DICKSTEINS et al, 1987; GILES et al, 1989; POWERS et al, 1987). É indicado para o tratamento de pacientes hemodinamicamente estáveis que sofreram infarto agudo do miocárdio nas últimas 24 horas, para prevenir o desenvolvimento subsequente de disfunção do ventrículo esquerdo ou insuficiência cardíaca, além de melhorar a sobrevida. Os pacientes devem receber, apropriadamente, o tratamento padrão recomendado: trombolíticos, ácido acetilsalicílico e betabloqueadores (MILLAR, 1986).

1.6.4. Relação dose-efeito:

A absorção de lisinopril é lenta atingindo a concentração plasmática máxima entre 6-8 h após sua administração oral, encontrando-se níveis plasmáticos detectáveis mesmo após 48 h. A atividade plasmática da ECA está associada com a concentração de lisinopril (DICKSTEINS, K., 1987). Os níveis circulantes de renina e angiotensina 1 aumentam enquanto as concentrações de angiotensina 2 caem rapidamente. A queda inicial da pressão arterial em pacientes está relacionada com os níveis de angiotensina 2 circulante, podendo ocorrer em 2h ou mais, dependendo da dose administrada. A duração do efeito agudo do lisinopril é dose-dependente até a concentração de 20 mg (BELISSANT et al, 1996). As dosagens dos componentes do sistema renina-angiotensina na circulação mostram que uma dose única de lisinopril (10 mg) pode suprir até 80 % da atividade basal da ECA por 24 horas. A concentração sistêmica retorna aos níveis encontrados antes do tratamento 10 a 24 horas após dose única, porém, permanece suprida por maior período em tratamentos crônicos (CIRILLO et al, 1986). O declínio das concentrações séricas exibe uma fase terminal prolongada que não contribui para o

acúmulo da droga. Essa fase terminal provavelmente representa ligações saturadas à ECA e não é proporcional à dose. Isso é acompanhado por uma queda da resistência vascular periférica total. O fluxo sanguíneo renal permanece inalterado ou discretamente aumentado (GOMEZ, 1989).

1.6.5. Esquema terapêutico

Para a definição do melhor esquema posológico individual, é importante que se considere o diagnóstico e a função renal. Uma dose inicial de 2.5 mg a 20 mg é utilizada normalmente, com o máximo não devendo ultrapassar 40 mg diários, para pacientes com função renal normal (DICKSTEINS et al, 1987; GAUTAM et al, 1987). Parece haver uma pequena vantagem no uso de duas administrações diárias. A interrupção da medicação não está relacionada à qualquer efeito indesejável, não há tolerância. Não há necessidade de ajuste da dose em caso de insuficiência hepática, exceto quando acompanhada de insuficiência renal (GAUTAM et al, 1987).

1.6.6. Sumário dos riscos potenciais para seres humanos

Lisinopril é bem tolerado para a maioria dos pacientes e efeitos adversos sérios são raros (LANCASTER & TODD, 1988). No estudo realizado em 1.476 pacientes, conduzido por RUSH & MERILL (1987), com a finalidade de verificar a segurança e tolerabilidade do lisinopril, as reações adversas mais comuns, encontradas após longos períodos de tratamento com lisinopril foram: cefaléia, tontura, tosse e diarreia.

Objetivo

2

O objetivo do estudo é verificar se o medicamento Lisinopril comprimido de 20 mg, fabricado pelo laboratório Medley S.A. Indústria Farmacêutica (lote LIC 06/01-1; validade: junho/03) é bioequivalente ao medicamento de referência Zestril® comprimido de 20 mg, fabricado pelo laboratório Astra Zeneca (lote A03534; validade: outubro/04), em termos de velocidade e extensão de absorção do ativo no organismo.

3.1.Casuística:

A população estudada englobou indivíduos oriundos da região, sem nenhuma restrição quanto ao grupo étnico. Para participar do estudo, foram selecionados vinte e seis voluntários sadios de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos e índice de massa corpórea entre 19 e 30.

A todos os voluntários foi dado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), para ser lido, entendido na íntegra e assinado.

Todos os voluntários admitidos para participar do estudo não apresentaram indícios de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica, identificadas pela anamnese, exame físico, neurológico, psiquiátrico, eletrocardiograma e exames laboratoriais como: glicemia de jejum, uréia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albumina, fosfatase alcalina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO/AST), transaminase pirúvica (TGP/ALT), colesterol total, triglicérides, ácido úrico, gama GT, hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, urina tipo I, protoparasitológico de fezes e teste de gravidez para as voluntárias (beta HCG) e sorologia negativa para hepatite B, hepatite C e síndrome de imunodeficiência adquirida.

3.2. Etapa clínica

A etapa clínica foi realizada no Hospital das Clínicas da UNICAMP. O estudo clínico foi conduzido segundo o protocolo clínico aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Segue, no Anexo 2, cópia do Parecer de Aprovação do CEP. O estudo teve delineamento aleatório, cruzado, aberto, de dois períodos e duas seqüências, dose única (20 mg), 26 voluntários sadios, de ambos os sexos (balanceado) e em jejum. O intervalo entre as internações foi de 2 semanas. A aptidão física dos voluntários para participar do estudo foi verificada através da avaliação da história médica, exames físicos e exames laboratoriais. Em cada período, os voluntários foram hospitalizados às 21 horas da noite anterior ao início do estudo, já tendo recebido dieta a que estavam habituados, quando iniciaram o jejum de, no mínimo, 8 horas antes da administração da medicação e

permaneceram em jejum 2 horas após à medicação. Após cumprido o horário de jejum, foram servidas refeições padronizadas 2h, 4h, 7-8h, 10-12h horas após à administração. A ingestão de líquidos foi permitida até 6 horas antes da administração da medicação e 2 horas após administração. A dieta (alimentos e líquidos) obedeceu o mesmo padrão para todos os voluntários e foi isenta de substâncias xantínicas. Outras restrições antes, durante e após o estudo, também foram estabelecidas no protocolo, como por exemplo restrições quanto ao uso de medicamentos em geral ou ingestão de álcool.

A administração consistiu em uma dose de lisinopril (20 mg) com 200 ml de água sem gás, obedecendo a aleatorização estabelecida previamente (Anexo 3). As coletas de sangue ocorreram nos tempos 0, 1h, 2h, 3h, 3h30min, 4h, 4h30min, 5h, 5h30min, 6h, 6h30min, 7h, 7h30min, 8h, 8h30min, 9h, 10h, 12h, 24h e 48h. Os voluntários permaneceram internados até a coleta de 12 horas, retornando ao hospital para as coletas dos tempos 24 e 48 horas. Após o término de todas as coletas, os voluntários realizaram os exames clínicos pós estudo (incluindo registro de ECG) e tiveram alta.

3.3. Etapa analítica

A etapa analítica consiste na fase de quantificação do fármaco no plasma. Foi realizada na Unidade Analítica Cartesius, localizada no prédio do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

3.3.1. Materiais:

Pipetas de 100 μ L, 200 μ L e 1000 μ L

Cartuchos de extração em fase sólida Oasis HLB 1 cc (30 mg)

Ponteiras descartáveis (de 5 – 200 μ L)

Tubos de vidro 120 x 11 mm

Tubos Eppendorf

Tubos de plástico de 50 mL

Auto injetor

3.3.2. Equipamentos:

Misturador Fisher Vortex Genie 2

Balança Analítica

- Sistema cromatográfico HPLC Hewlett-Packard:

Cromatógrafo líquido

Degaseificador

Auto injetor

Coluna analítica Genesis C8 4.0 μm (150 mm x 4.6 mm d.i.)

- Espectrômetro de massas:

Micromass Quattro II com fonte de ionização *electrospray* operando no modo positivo.

- Sistema de análise de dados:

MassLynx (versão 3.2) em Windows NT (versão 4.0) em Digital Celebris GL 6200 PC.

3.3.3. Substâncias Padrões:

- Analito:

Lisinopril

Fabricante: LUPIN Lab. Ltda.

Lote: 141037

- Padrão interno:

Enalaprilato (padrão de referência certificado pela USP)

Lote: I

3.3.4. Reagentes:

Acetonitrila – grau HPLC

Ácido acético glacial – grau analítico

Metanol – grau HPLC

Água Purificada

Trietilamina – grau analítico

Ácido clorídrico 12 M – grau analítico

3.3.5. Espécies biológicas:

Amostras de plasma coletadas de diferentes indivíduos, nas seguintes condições:

Plasma humano normal

Plasma humano hiperlipêmico

Plasma humano hemolizado

3.3.6. Soluções utilizadas no ensaio

- Soluções mãe:

solução padrão de lisinopril 1 mg/mL (diluyente: água/metanol 50/50 v/v)

solução padrão de enalaprilato 1 mg/mL (diluyente: água)

- Soluções de trabalho:

A partir de sucessivas diluições da solução mãe de **lisinopril**, utilizando como diluyente água/metanol (50/50 v/v), obtiveram-se as concentrações de 100 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,02 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,06 µg/mL.

A partir de uma diluição da solução mãe de **enalaprilato**, utilizando como diluyente água, obteve-se a concentração de 2 µg/mL.

Fase móvel: acetonitrila/água (60/40 v/v) + 20 mM ácido acético + 4,3 mM de trietilamina

Solução A: acetonitrila/água (80/20 v/v) + 10 mM ácido acético.

Solução de lavagem: solução aquosa de ácido clorídrico (10 mM).

3.3.7. Quantificação das amostras

A quantificação foi feita às cegas, no que tange à aleatorização, evitando-se assim tendência na análise de bioequivalência.

Para a determinação de lisinopril nas amostras de plasma foi realizada uma curva de calibração, cujo intervalo entre a concentração mínima e a concentração máxima foi elaborado de acordo com as características do fármaco e da dose administrada no estudo, a fim de englobar todas ou quase todas as concentrações a serem obtidas nas quantificações. Para garantir a reprodutibilidade do aparelho durante o ensaio, injetou-se uma amostra de concentração conhecida, denominada amostra de controle de qualidade. Foram utilizados três controles de qualidade (CQ), e cada um deles era injetado durante as quantificações das amostras na ordem da menor concentração à maior concentração, intercalados a cada 10 amostras analisadas. As concentrações dos CQ utilizadas no estudo foram: 6 ng/mL (3 vezes o valor do LQ), 30 ng/mL (valor intermediário entre CQ baixo e CQ alto) e 150 ng/mL (75 % da maior concentração da curva de calibração). Os padrões da curva de calibração e os controles de qualidade foram preparados na mesma matriz biológica das amostras (plasma). O limite de quantificação (LQ) utilizado no estudo foi de 2 ng/mL.

3.3.7.1. Preparação da curvas de calibração

A curva de calibração consistiu de um branco (matriz processada sem o padrão interno), amostra zero (matriz processada com o padrão interno) e as amostras padrões a serem quantificadas. As amostras padrões foram preparadas adicionando aos plasmas humanos controle as soluções padrões de trabalho com o analito a ser quantificado, conforme ilustrado no quadro 1.

Quadro 1: Preparação das soluções padrão da curva de calibração

Analito	Curva de calibração (concentração no plasma)	Volume e Concentração da solução de trabalho		Volume de plasma adicionado	Volume total	Fator de Diluição
Lisinopril	200 ng/mL	1,0 mL	2000 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	100 ng/mL	1,0 mL	1000 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	50 ng/mL	1,0 mL	500 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	20 ng/mL	1,0 mL	200 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	10 ng/mL	1,0 mL	100 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	5 ng/mL	1,0 mL	50 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Lisinopril	2 ng/mL	1,0 mL	20 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
Zero	0	1,0 mL	-	-	-	-
Branco	0	1,0 mL	-	-	-	-

3.3.7.2. Preparação dos controles de qualidade (CQ)

As amostras de controle de qualidade foram preparadas adicionando aos plasmas humanos controle as soluções padrões com o analito a ser quantificado, conforme ilustrado no quadro 2 a seguir.

Quadro 2: Preparação das amostras de controle de qualidade de lisinopril

CQ	Controles de Qualidade (concentração no plasma)	Volume e Concentração da solução de trabalho		Volume de plasma adicionado	Volume total	Fator de Diluição
CQA	6 ng/mL	1,0 mL	60 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
CQB	30 ng/mL	1,0 mL	300 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10
CQC	150 ng/mL	1,0 mL	150 ng/mL	9,0 mL	10 mL	10

3.3.7.3. Critérios de aceitação ou rejeição da corrida analítica (validação da corrida analítica)

A corrida analítica consistiu na curva de calibração, controle de qualidade e quantificação do analito nas amostras coletadas. O coeficiente de variação máximo permitido para os CQs foi de 15 %, podendo haver 2 rejeições por corrida analítica, desde que não fosse da mesma concentração. Para o LQ, o coeficiente de variação máximo permitido foi de 20 %. Para a curva de calibração, pelo menos 5 das 7 concentrações deveriam apresentar coeficiente de variação de, no máximo, 15 % (desde que não fosse a menor e/ou a maior concentração). Para a menor concentração da curva de calibração, o coeficiente de variação não pôde exceder 20 %. O coeficiente de linearidade da curva foi de, no mínimo, 0,95.

3.3.7.4. Extração das amostras

O processo de extração foi aplicado para as amostras dos voluntários, amostras da curva de calibração e amostras dos controles de qualidade.

Processo de extração: foram colocados tubos de vidro teste (10 x 75 mm) em um suporte, devidamente numerados de acordo com as amostras a serem quantificadas. Em seguida, dispensou-se 400 µL de solução de lavagem nos tubos para ensaio e foram adicionados 500 µL de amostras de plasma humano. Agitou-se por 10 segundos. Com o uso de uma pipeta, em cada tubo foi adicionado 50 µL da solução de enalaprilato 2 µg/mL (padrão interno) e agitou-se por 10 segundos e a mistura foi deixada por 5 minutos em repouso a temperatura ambiente. Os cartuchos para extração em fase sólida *Oasis® HLB da Waters* foram pré-condicionados com 2 mL de metanol e em seguida com 1 mL da solução A. Cada amostra de plasma a ser quantificada foi colocada nos cartuchos de extração em fase sólida individualmente. As amostras foram lentamente coletadas, sob vácuo. Os cartuchos foram lavados 5 vezes com 1 mL solução de lavagem, sob vácuo leve. Após a eluição dos interferentes, os cartuchos foram colocados nos tubos de vidro adequadamente identificados, e os analitos foram eluídos com 0,5 mL de metanol, sob pressão positiva, usando fluxo de nitrogênio. O metanol foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 37 ° C. Este processo foi conduzido em capela. Os resíduos foram dissolvidos com 0,2 mL da solução A. A solução resultante foi homogeneizada no *Vortex-mix* por 15

segundos para reconstituição dos resíduos. Esta solução foi transferida para os frascos individuais usando pipetas automáticas com ponteiros descartáveis. Os frascos foram tampados e colocados no suporte do auto injetor para a leitura no sistema HPLC acoplado ao espectrômetro de massas.

3.3.7.5. HPLC/MS/MS

- Condições cromatográficas, definidas durante à validação:

Coluna analítica: Genesis C8, 4 μm (150 mm x 4,6 d.i.).

Fase móvel: acetonitrila/água (60/40 v/v) + 20 mM ácido acético + 4,3 de trietilamina.

Fluxo: 0,5 mL/min.

Pressão: 60 – 100 bar.

Temperatura da coluna: 40 °C

Temperatura do autoinjeter: 5 °C

Volume de injeção: 30 μL .

Tempo total de corrida: 6,5 min.

Tempo de retenção de lisinopril e enalaprilato: aproximadamente 4,0 min.

O efluente da coluna cromatográfica foi dividido e 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. foram dirigidos para o espectrometro de massas.

- Condições do espectrometro de massas, definidas durante a validação

O espectrômetro de massas Quattro II operou no modo de ionização em *electrospray* positivo (ES+). Os íons resultantes das moléculas lisinopril e enalaprilato foram monitorados no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*):

Analitos	Íon selecionador	Íon “filho”	Intervalo de tempo para o monitoramento de cada transição (s)	Voltagem do Cone (V)	Energia de colisão (eV)
Lisinopril	406	84	0.8	20	15
Enalaprilato	349	206	0.8	25	20

Seguem, nas figuras 3 e 4, as rotas de fragmentação propostas para as moléculas do lisinopril e enalaprilato, respectivamente.

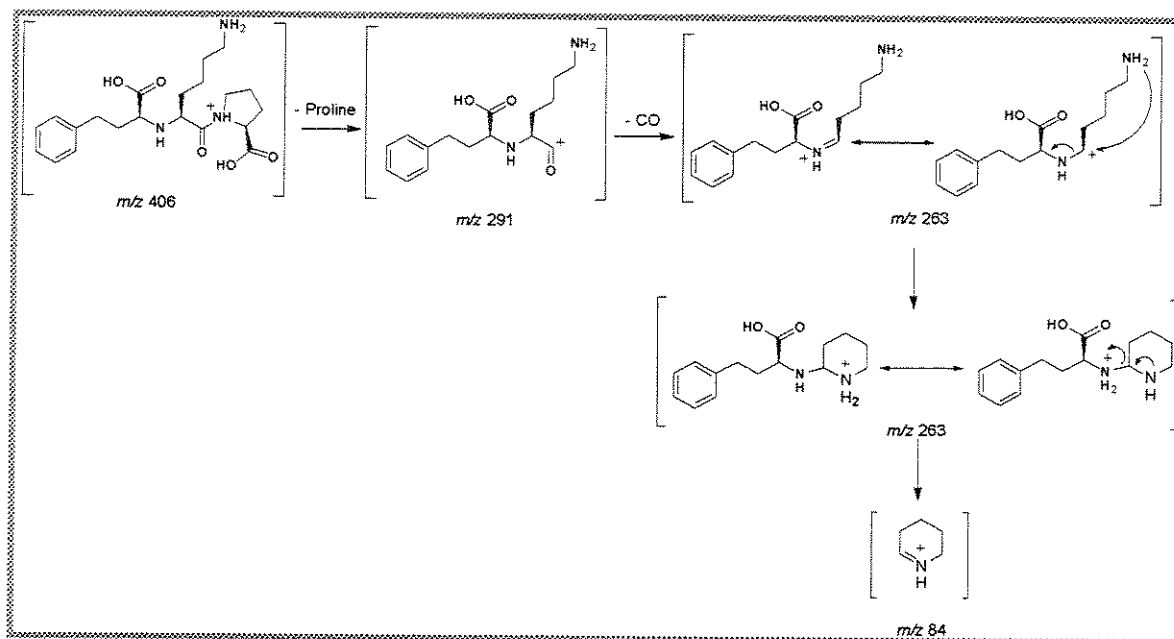


Figura 3: proposta de fragmentação da molécula lisinopril

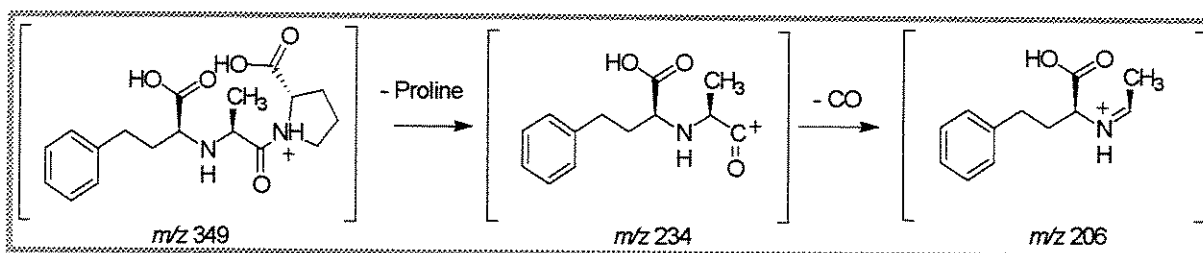


Figura 4: proposta de fragmentação da molécula de enalapril

Para aquisição dos dados e quantificação foi utilizado o programa computacional *MassLinx*.

3.3.8. Validação do método analítico empregado

O método analítico descrito foi devidamente validado, para garantir a confiabilidade dos resultados. Para validar a metodologia analítica, foram avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade/seletividade, linearidade, exatidão e

precisão intra e inter corrida analítica e recuperação do método de extração, levando em consideração a estabilidade dos analitos nas condições experimentais.

- **Especificidade/seletividade:** para a verificação da especificidade do método foram utilizadas 6 amostras de plasma, das quais 4 foram colhidas em jejum, 1 hiperlipêmica e 1 com hemólise. As três condições do plasma são as mesmas que podem ser encontradas nas amostras de sangue de voluntários durante o estudo. A especificidade é comprovada pela determinação da inexistência de interferência significativa no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno. Esta análise foi feita através da comparação visual dos cromatogramas obtidos das amostras acima descritas, após terem sido processadas (extraídas e analisadas), conforme descrito no método, com os cromatogramas obtidos de soluções aquosas do analito numa concentração próxima ao Limite de Quantificação (LQ).

- **Sensibilidade:** é definida como a menor concentração mensurável do analito em uma amostra que pode ser determinada, com precisão e exatidão aceitáveis (LQ). Para o limite de quantificação ser aprovado, devem ser satisfeitos os seguintes critérios:

- Inexistência de interferência ou resposta 5 vezes maior que qualquer interferência existente nos cromatogramas de plasmas brancos nos tempos de retenção em uso;
- Pico de resposta do fármaco identificável e reprodutível, com precisão de 20 % e exatidão entre 80 a 120 %, na análise de 8 alíquotas.

- **Linearidade:** a curva de calibração, cujos pontos são quantificados em duplicata, é aprovada se forem satisfeitos os seguintes critérios:

- 4 de 6 padrões das diferentes concentrações, incluindo o padrão correspondente ao LQ e o padrão de maior concentração, com desvio menor do que 15 % da respectiva concentração nominal (menor que 20 % para o LQ) em pelo menos uma das duplicatas.
- Coeficiente de correlação linear maior ou igual a 0,95

- **Precisão e exatidão intra corrida analítica:** é avaliada a partir da quantificação de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade CQA, CQB e CQC) determinadas em função da faixa de concentrações esperadas,

tomando-se 8 alíquotas de cada concentração quantificadas durante uma única corrida analítica (precisão e exatidão intra-corrida analítica). Os critérios para aprovação destes quesitos seguem descritos abaixo:

Precisão: para cada concentração, o coeficiente de variação (CV %) calculado com 8 alíquotas não pode exceder 15 % (tolerância de 20 % para o LQ).

Exatidão: para cada concentração, a média da concentração calculada partindo de 8 alíquotas deveriam estar entre 85 e 115 % do valor nominal da concentração padrão em questão.

- **Precisão e exatidão inter corridas analíticas:** é avaliada a partir da determinação da precisão e exatidão entre corridas analíticas diferentes, através da quantificação, para cada uma das corridas, de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade CQA, CQB e CQC), determinadas em função da faixa de concentrações esperadas, tomando-se como base 8 alíquotas de cada concentração.

Os critérios para validação deste parâmetro seguem descritos abaixo:

Precisão: para cada concentração, o coeficiente de variabilidade (CV %) calculado com 8 alíquotas não pode exceder 15 % (tolerância de 20 % para o LOQ).

Exatidão: para cada concentração, a média da concentração calculada partindo de 8 alíquotas deve situar-se entre 85 e 115 % do valor nominal da concentração padrão em questão.

- Recuperação:

A eficiência de extração do método analítico foi avaliada utilizando uma corrida analítica específica, contendo as seguintes amostras:

- 5 amostras de controles de qualidade para cada concentração (baixa, média e alta), obtidas pelo processo usual de extração do método proposto.

A recuperação foi calculada dividindo a área média da amostra extraída pela área média da amostra não extraída, para cada concentração correspondente.

3.3.9. Testes de Estabilidade do fármaco nas condições experimentais

A estabilidade dos compostos foi determinada em função do tempo necessário para a preparação de amostras e respectiva quantificação, bem como das temperaturas de armazenamento usualmente empregadas, das propriedades químicas do fármaco, da matriz biológica na qual o fármaco está inserido e do recipiente onde as amostras foram armazenadas. Para sua realização foram utilizadas três concentrações distintas do analito e do padrão interno (quando for o caso) a serem dosados, uma concentração baixa, uma média e uma alta. As amostras que são utilizadas nos testes de estabilidade foram preparadas na mesma matriz biológica e extraídas da mesma forma que as amostras utilizadas na quantificação do fármaco no estudo propriamente dito, com a finalidade de simular as condições experimentais do mesmo. A significância dos resultados obtidos foi analisada pelo teste *t* the Student onde $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Estas amostras preparadas para a condução dos estudos de estabilidade foram submetidas aos seguintes testes, descritos abaixo:

. **Estabilidade no autoinjeter:** verificou-se a estabilidade do fármaco e padrão interno em fase móvel, na temperatura encontrada no autoinjeter, por período de tempo igual ou superior a uma corrida analítica, que foi de 28 horas.

. **Congelamento e descongelamento:** verificou-se a estabilidade do fármaco em plasma após 3 ciclos de congelamento a uma temperatura de -20°C por 24 horas e descongelamento em temperatura ambiente.

1º ciclo: 24 horas de congelamento

2º ciclo: 12 horas de congelamento

3º ciclo: 12 horas de congelamento

. **Estabilidade de curto período em temperatura ambiente:** determinou a estabilidade do fármaco em plasma em temperatura ambiente, por período de tempo de 6 horas, tempo este superior ao tempo para o preparo das amostras para uma corrida analítica.

. **Estabilidade de longo período:** determina a estabilidade do fármaco em plasma na temperatura de congelamento das amostras (-20°C), por período de tempo igual ou superior ao intervalo entre o primeiro dia de coleta das amostras e o dia da análise da última amostra, ou seja, por um período superior a 52 dias.

. **Estabilidade das soluções de trabalho:** foi verificada a estabilidade do fármaco e do padrão interno a partir das soluções de trabalho preparadas, na temperatura em que foram armazenadas (em geladeira a 4°C), por período de tempo superior ao tempo em que as soluções permaneceram armazenadas durante o ensaio.

3.4. Etapa estatística

As análises estatísticas dos dados foram conduzidas após a transformação logarítmica baseada em modelo aditivo para todos os valores de ASC_{0-t} e C_{max} . O t_{max} foi estatisticamente avaliado utilizando a diferença individual, construindo um intervalo de confiança de 90 %, através de teste não paramétrico. Os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} last (pareado), ASC_{0-inf} , ASC_{0-48} – linear, $t_{1/2}$ e K_e foram calculados, porém, estes parâmetros não foram considerados no cálculo de bioequivalência. Para decisão de bioequivalência, a análise considerará como variável alvo ASC_{0-t} e C_{max} .

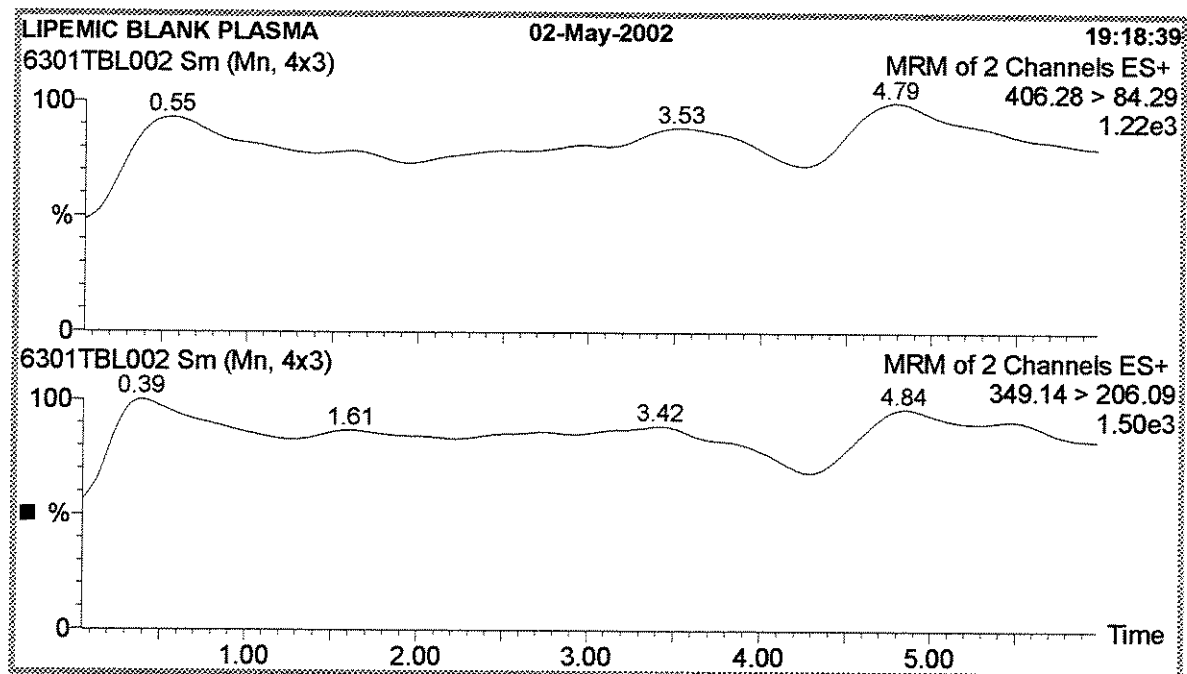
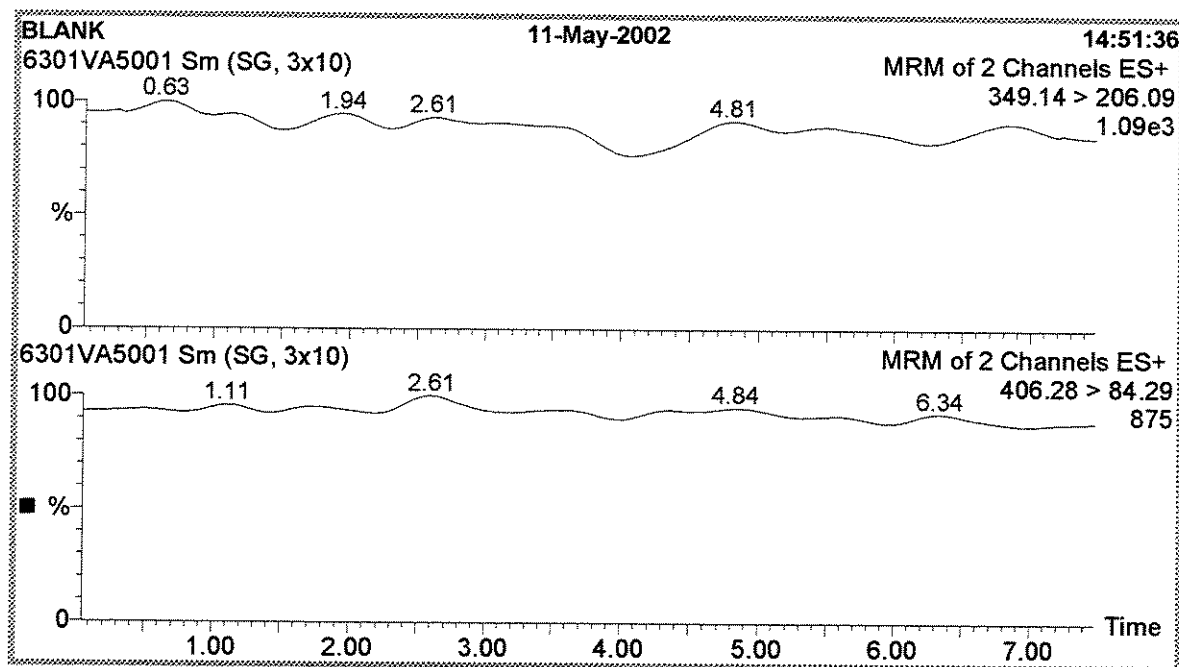
Foi empregada análise de variância (ANOVA) apropriada para o modelo de 2 períodos cruzados, sob os dados de $\ln ASC_{0-t}$ e $\ln C_{max}$, levando em consideração os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período. Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação teste/formulação referência) para os valores ASC_{0-t} e C_{max} . A biodisponibilidade relativa da formulação teste *versus* a formulação referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas (pontos estimados). O intervalo de confiança (IC) estipulado para a razão das médias geométricas entre R e T foi de 90 % e determinado por análises paramétricas (dois testes t unicaudais – $p=0.05$). A construção do intervalo de confiança foi baseada no quadrado médio residual da ANOVA. As formulações foram consideradas bioequivalentes quando o IC acima mencionado (IC 90 %) para os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} e C_{max} estiverem dentro do intervalo de 80 a 125 %, aceito pela ANVISA e FDA.

O número planejado da amostra foi de 26 voluntários, conforme recomendação da ANVISA (geralmente 24 voluntários), com adição de 2 voluntários, em casos de

possíveis desistências. A análise farmacocinética foi realizada com o apoio dos seguintes programas: Microsoft Excel Version 7.0 ou posterior; *WinNonLin Professional Network Edition*, Versão 1.5; *Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies* – versão 3.4., por *Jerman P Wijnand*; ou posterior e *Graph Pad prism* Versão 3.02 ou posterior. A entrada de dados e seu processamento inicial foi realizado através de arquivos MS Excel, com base nos dados derivados dos equipamentos de análise.

4.1. Validação do Método Analítico

Especificidade:



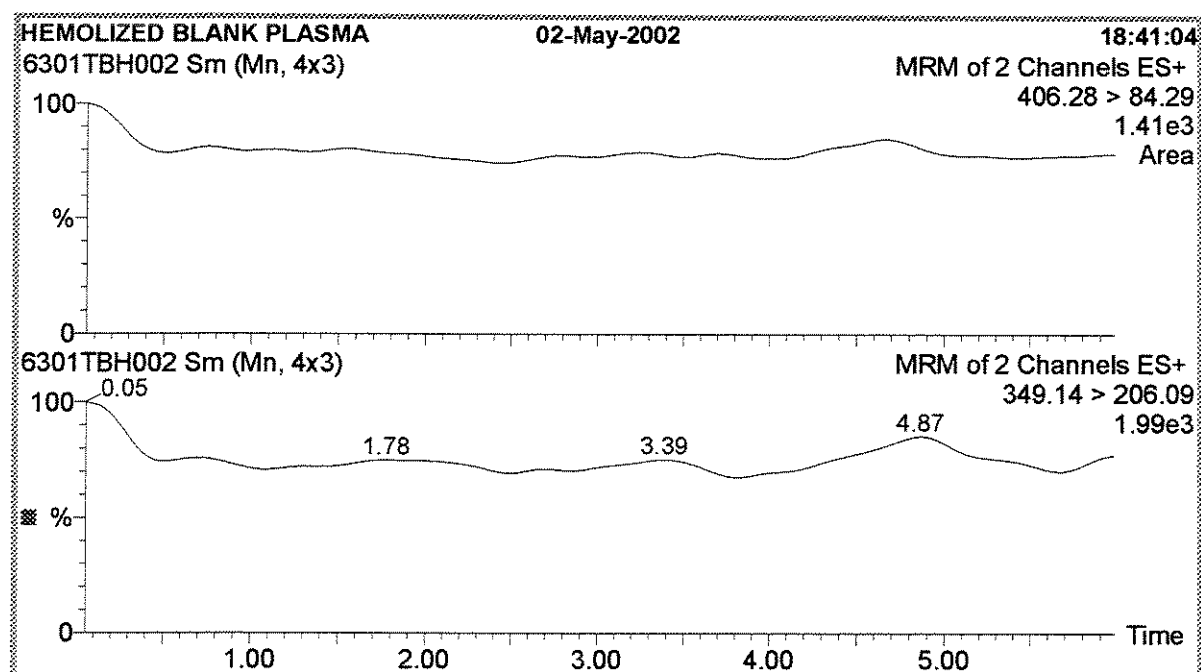


Figura 5: Cromatogramas de amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado

. Sensibilidade:

Quadro 3: Validação do LOQ de 2ng/ml

Concentração nominal	Concentração obtida (ng/mL)
2 ng/mL	2,08
	2,09
	1,86
	1,76
	1,77
	2,22
	2,14
	1,90
Média (ng/mL)	1,98
Precisão (CV %)	8,9
Exatidão (%)	98,9

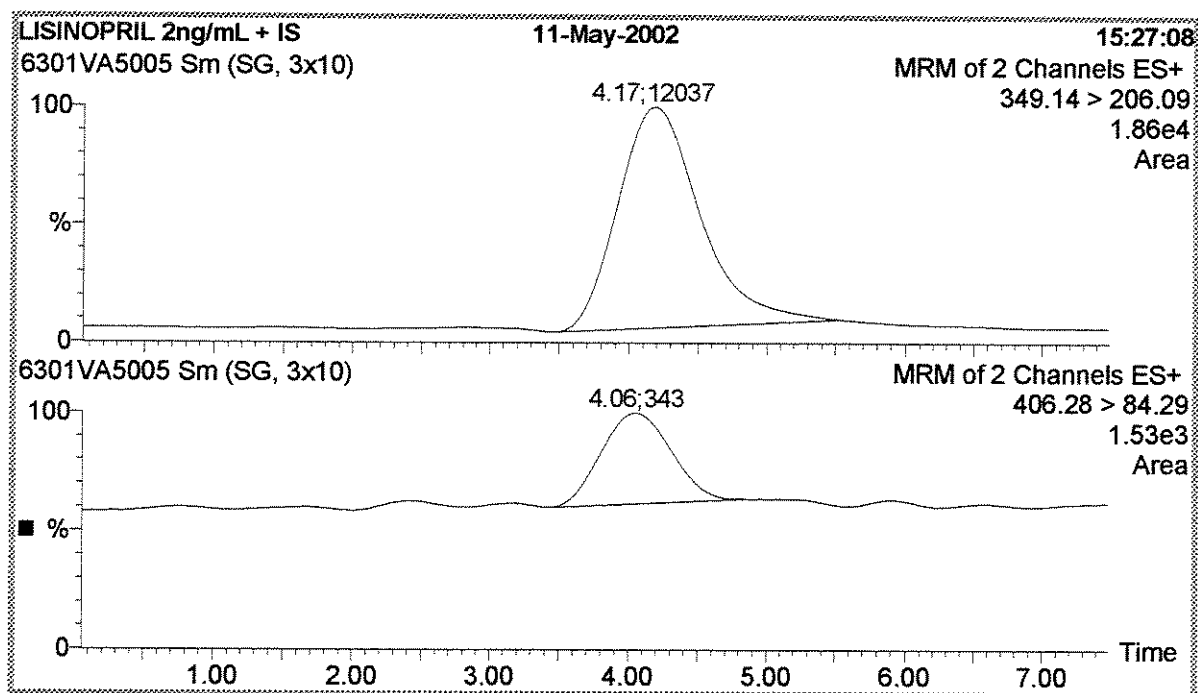


Figura 6: cromatograma do LO

. Linearidade:

Quadro 4: dados de validação da curva de calibração

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	Desvio (%)	Analito aprovado?	Concentração aprovada?
2	2,04	2,00	Sim	Sim
	1,90	- 5,00	Sim	
5	4,95	- 1,00	Sim	Sim
	4,67	- 6,60	Sim	
10	10,12	1,20	Sim	Sim
	9,05	- 9,50	Sim	
20	20,63	3,15	Sim	Sim
	19,03	- 4,85	Sim	
50	57,55	15,10	Não	Sim
	54,39	8,78	Sim	
100	101,78	1,78	Sim	Sim
	102,76	2,76	Sim	
200	198,14	- 0,93	Sim	Sim
	187,00	- 6,50	Sim	

Coefficiente de correlação linear: 0,998301.

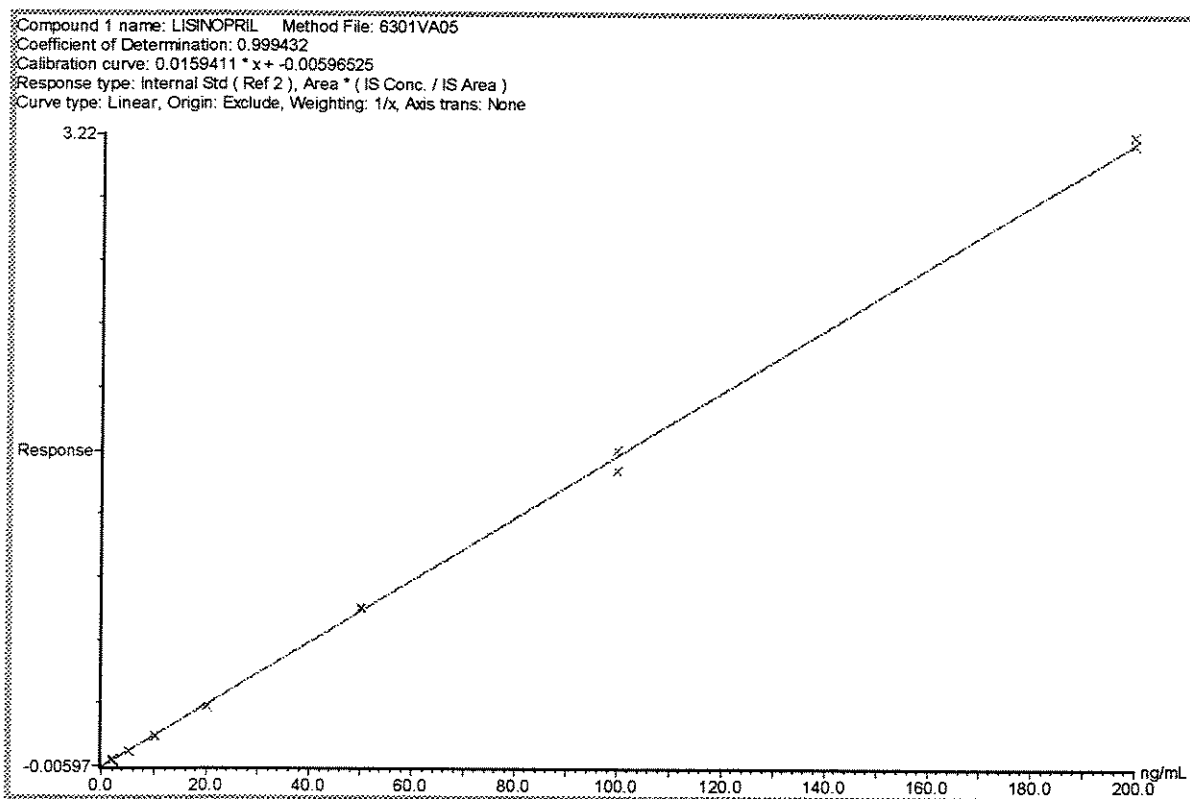


Figura 7: curva de calibração

. Precisão intra lote:

Quadro 5: Precisão e Exatidão intra corrida analítica.

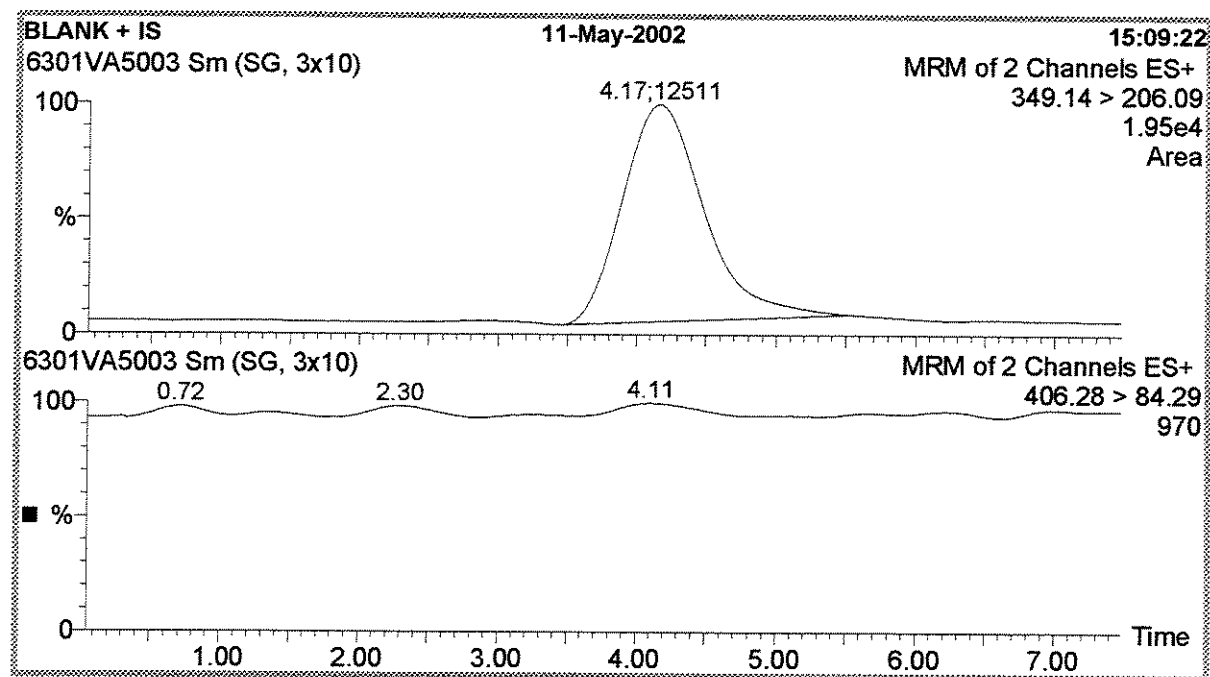
Código da amostra	Concentrações obtidas das amostras individuais (ng/mL)								Validação da corrida analítica, considerando os parâmetros precisão e exatidão		
	1	2	3	4	5	6	7	8	Media	CV (%)	Exatidão (%)
LOQ (2 ng/mL)	1,71	1,91	-	1,96	1,71	1,84	-	1,80	1,82	5,0	91,2
CQA (30 ng/mL)	6,05	5,54	6,32	5,94	5,49	6,52	5,77	6,24	5,98	6,2	99,7
CQB (60 ng/mL)	27,0	29,5	26,4	28,2	27,7	28,8	26,5	34,0	28,5	8,2	95,0
CQC (150 ng/mL)	178	149	153	159	157	176	170	167	164	7,2	109,1

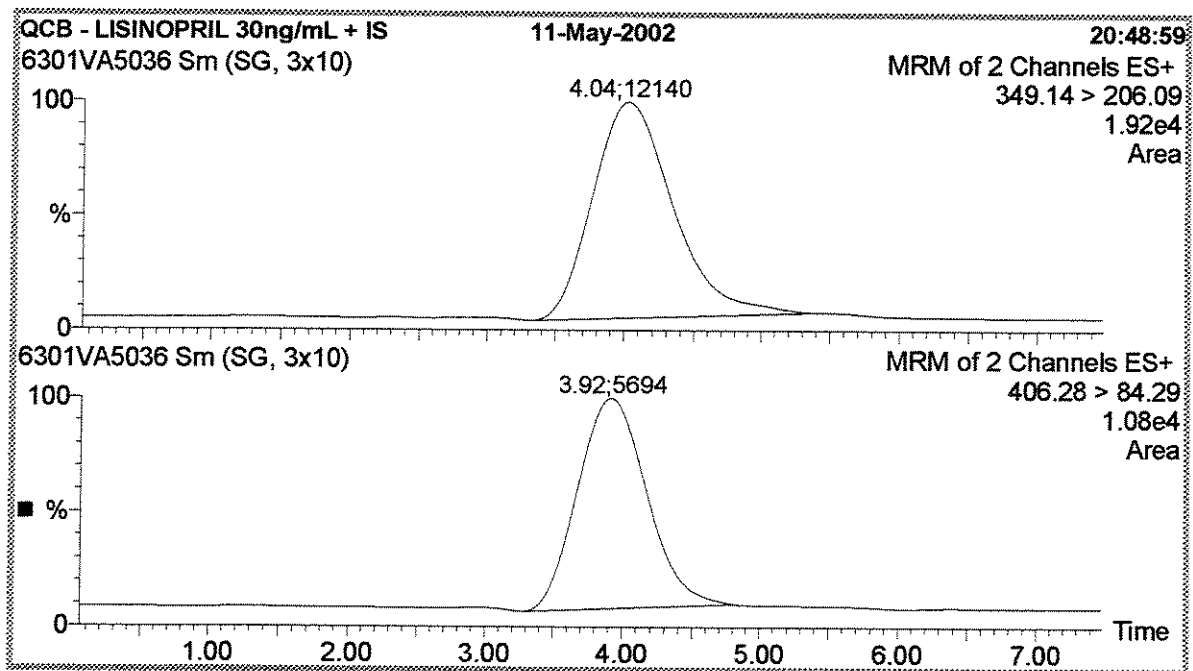
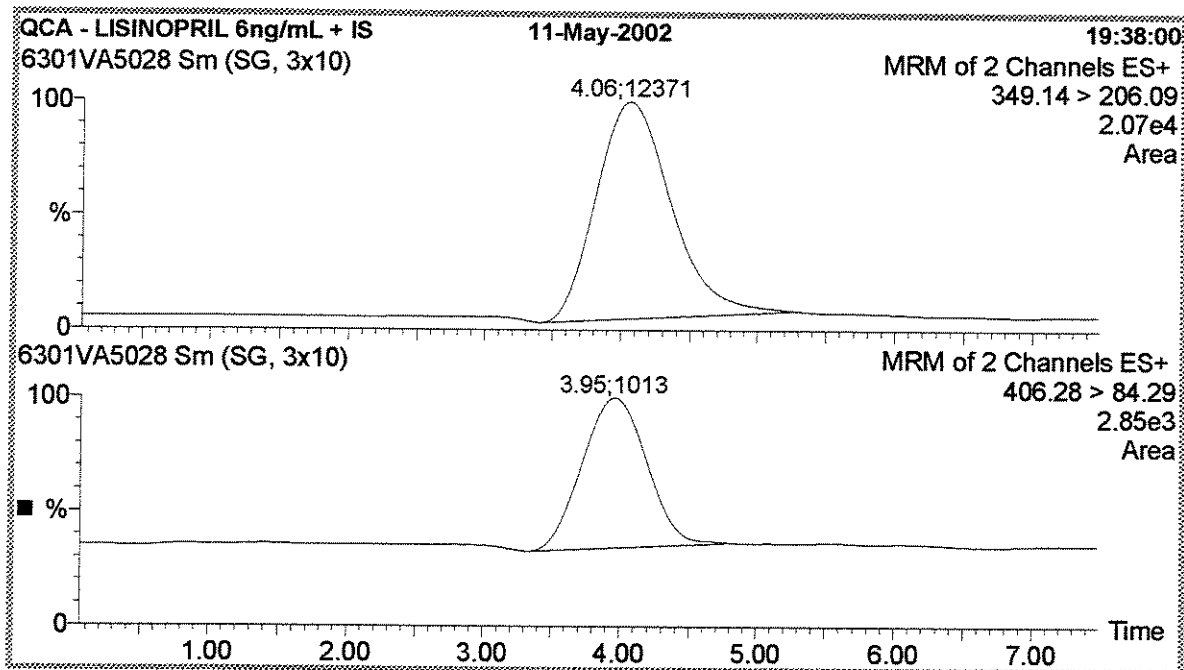
. Precisão inter corrida analítica

Quadro 6: Precisão e Exatidão inter corrida analítica

Código da amostra	Concentração média individual de cada corrida (ng/mL)			Reprodutibilidade entre as 3 corridas analíticas analisadas		
	Corrida Analítica 1	Corrida Analítica 2	Corrida Analítica 3	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
LOQ (2 ng/mL)	1,82	1,98	2,06	1,95	6,2	97,7
CQA (30 ng/mL)	5,98	5,47	5,52	5,66	5,0	94,3
QCB (60 ng/mL)	28,5	26,7	29,4	28,2	4,9	94,0
QCC (150 ng/mL)	164	134	146	148	10,0	98,6

Na figura 10, a seguir, são mostrados os cromatogramas obtidos das amostras zero, QCA, QCB e QCC nas condições cromatográficas descritas no método.





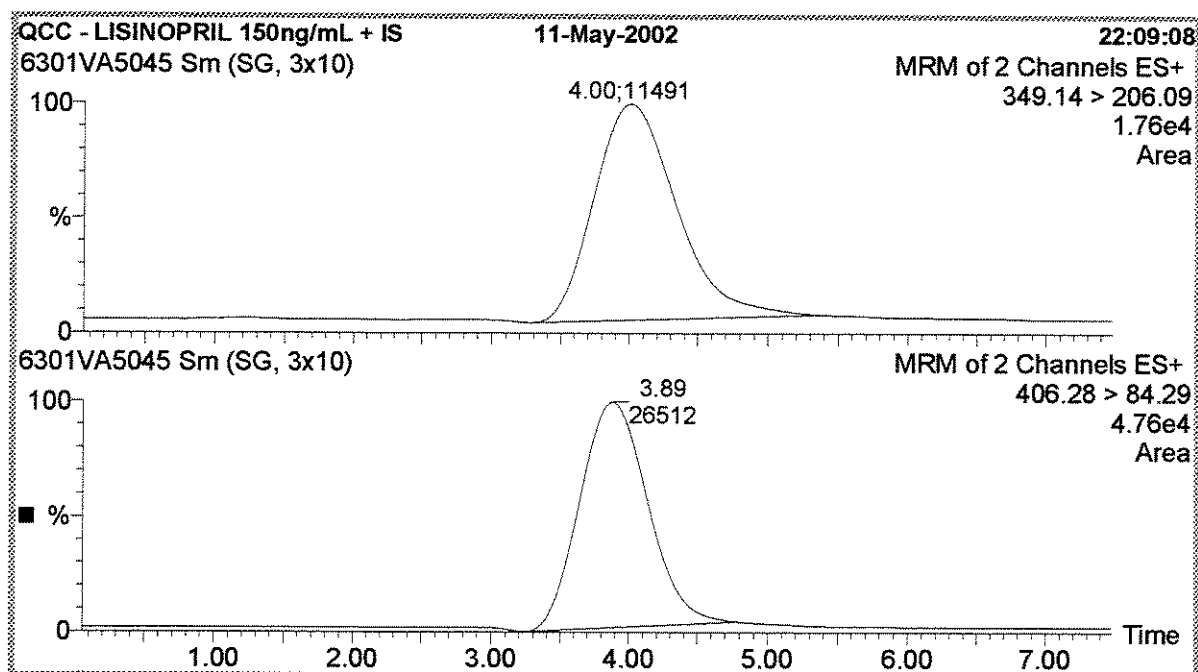


Figura 8: Cromatogramas de amostras zero (branco + padrão interno), amostras QCA (6 ng/ml + Padrão Interno), amostras de QCB (30 ng/ml + Padrão Interno) e de amostras de QCC (150 ng/ml + Padrão Interno).

. Recuperação

Quadro 7: resultados do teste de recuperação

Analitos	Resultados do teste de recuperação					
	Código da amostra	Concentração da amostra	Amostras extraídas (média de 5 áreas)	Amostras não extraídas (média de 5 áreas)	Recuperação (%)	Desvio Padrão (n=5)
Lisinopril	Baixo	3 ng/mL	1118	1412	79,2	5,9
	Médio	30 ng/mL	5528	6884	80,3	3,4
	Alto	150 ng/mL	26857	32563	82,5	3,9
Enalaprilato	-	250 ng/mL	10593	13633	77,7	7,2

4.2. Testes de estabilidade

. Estabilidade no auto injetor

Quadro 8: Resultados analíticos dos testes de estabilidade no auto injetor

Resultados do Teste de estabilidade no autoinjeto a 5°C (em ng/mL)						
Concentração das amostras	6 ng/mL		30 ng/mL		150 ng/mL	
Tempo analisado	Tempo 0h	Após 56 h	Tempo 0 h	Após 56 h	Tempo 0 h	Após 56 h
Média (n=5) (ng/mL)	5,52	5,70	29,4	29,6	146	148
CV (%)	5,7	9,5	3,0	4,0	2,0	2,7
Variação (%)	3,4		0,6		1,2	

. Estabilidade de três ciclos de congelamento/descongelamento

Quadro 9: Resultados analíticos dos testes de estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento.

Resultados do Teste de estabilidade após três ciclos de congelamento de descongelamento (em ng/mL)						
Concentração das amostras	3 ng/mL		30 ng/mL		150 ng/mL	
Tempo analisado	Amostra recém-preparada	Após 3º ciclo	Amostra recém-preparada	Após 3º ciclo	Amostra recém-preparada	Após 3º ciclo
Média (ng/mL) (n=5)	3,25	3,02	34,2	31,2	163	160
CV (%)	7,7	4,8	2,5	1,8	5,7	5,1
Variação (%)	- 7,0		- 8,6		- 1,9	

. Estabilidade de curta duração

Quadro 10: Resultados dos testes de estabilidade de curta duração, após 6 horas à temperatura ambiente.

Resultados do Teste de Estabilidade de curto período em temperatura ambiente (ng/mL)						
Concentração das amostras	3 ng/mL		30 ng/mL		150 ng/mL	
Tempo analisado	Amostra recém-preparada	Após 6h em temp. ambiente	Amostra recém-preparada	Após 6h em temp. ambiente	Amostra recém-preparada	Após 6h em temp. ambiente
Média (ng/mL) (n=5)	3,25	2,97	34,2	36,3	163	169
CV (%)	7,7	19,0	2,5	1,9	5,7	16,8
Variação (%)	- 8,5		6,1		3,8	

. Estabilidade de longa duração

Quadro 11: Resultados dos testes de estabilidade de longa duração

Resultados do Teste de Estabilidade de longa duração (ng/mL)						
Concentração das amostras	6 ng/mL		30 ng/mL		150 ng/mL	
Tempo analisado	Amostra recém-preparada	Após 148 dias cong. à 20° C	Amostra recém-preparada	Após 148 dias cong. à 20° C	Amostra recém-preparada	Após 148 dias cong. à 20° C
Média (ng/mL) (n=5)	6,22	5,48	30,9	29,1	153	135
CV (%)	8,7	8,8	12,8	3,6	5,0	5,4
Variação (%)	- 11,8		- 5,8		- 12,0	

. Estabilidade das soluções padrão

Quadro 12: Resultados analíticos dos testes de estabilidade das soluções padrão.

Analitos	Concentração da solução referência	Área média obtida da solução recém-preparada (n=5)	Área média obtida da solução estocada a - 4° C (n=5)	Variação média (%)
Lisinopril (23 dias)	1000 ng/mL	101823	88696	- 12,9
Enalaprilato (11 dias)	1000 ng/mL	4566	4370	- 4,3

4.3. Etapa clínica

Na etapa clínica, todos os voluntários aderiram aos procedimentos estabelecidos no protocolo. Na tabela 1 consta a análise descritiva dos voluntários. Não houve desistência e/ou retirada de voluntários, todas as amostras previstas no protocolo foram coletadas e não houve perdas. As formulações foram bem toleradas. A única reação adversa relatada durante o estudo foi cefaléia (Quadro 13).

Tabela 1: análise descritiva dos voluntários

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m2)
1	H	33	78,8	179	25
2	H	33	84,8	190	24
3	H	23	73,6	186	21
4	H	41	85,5	174	28
5	H	27	65,0	175	21
6	H	28	71,2	183	21
7	H	25	87,0	187	25
8	H	40	81,0	180	25
9	H	33	74,8	170	28
10	H	33	64,4	164	26
11	H	35	74,7	167	27
12	H	27	57,5	168	20
13	M	36	72,2	166	26
14	M	27	65,0	160	25
15	M	27	69,0	164	26
16	M	29	68,8	158	27,5
17	M	25	59,0	161	23
18	M	24	58,0	164	21
19	M	32	56,2	157	23
20	M	27	52,0	155	22
21	M	27	62,3	154	26
22	M	29	57,0	163	21,5
23	M	26	63,0	166	23
24	M	36	68,0	163	23
25	M	36	58,2	163	22
26	M	30	56,1	155	23
Média	-	30	68,8	168,15	23,96
DP (%)	-	4,9	10,0	10,5	2,4

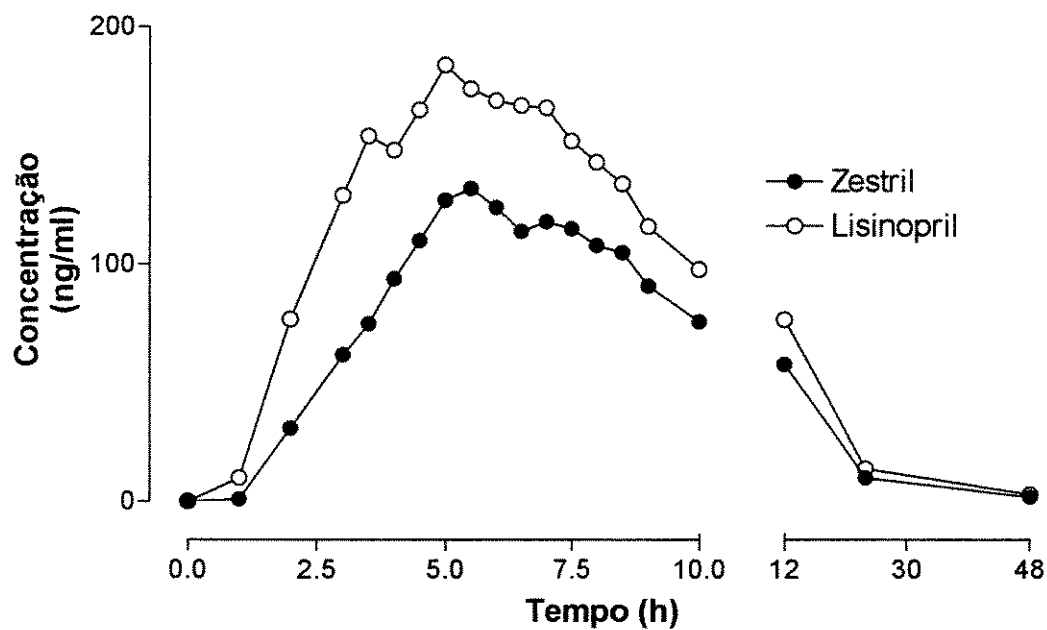
Quadro 13: Reações adversas ocorridas durante o estudo

Vountário	Reação Adversa	Conduta Médica	Medicamento administrado no Período de ocorrência do Evento
11	Dor de cabeça	Dipirona gotas 875 mg	Referência
14	Dor de cabeça	Dipirona gotas 750 mg	Referência
17	Dor de cabeça	Paracetamol gotas 300 mg	Teste
19	Dor de cabeça	Paracetamol gotas 300 mg	Teste
26	Dor de cabeça	Paracetamol gotas 200 mg	Teste

**Curva de concentração plasmática *versus*
tempo dos voluntários, para as duas
formulações**

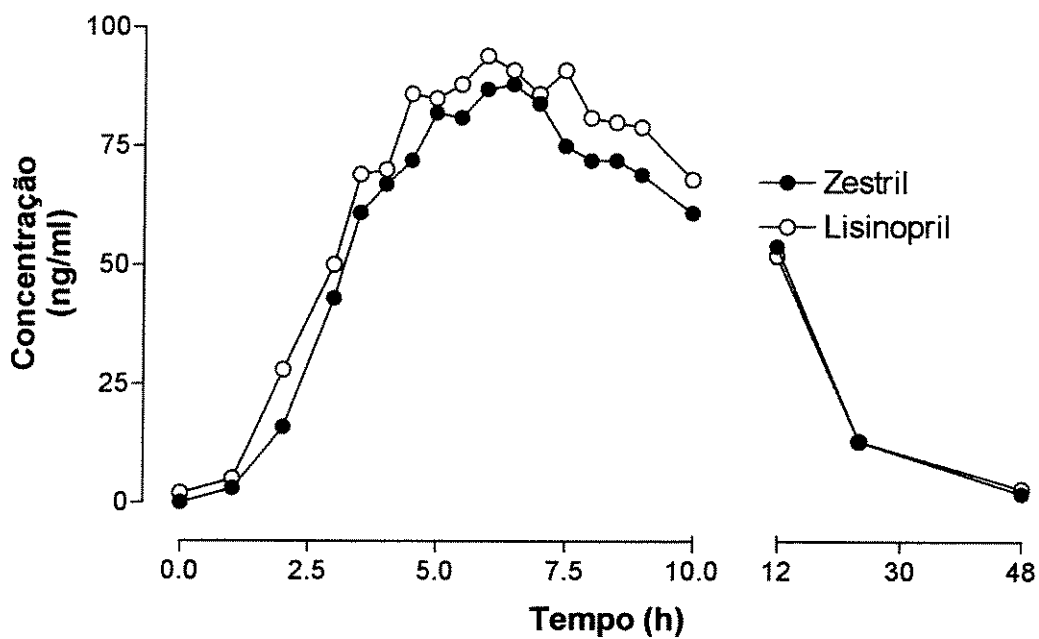
4.1

Vol I - VR050370M



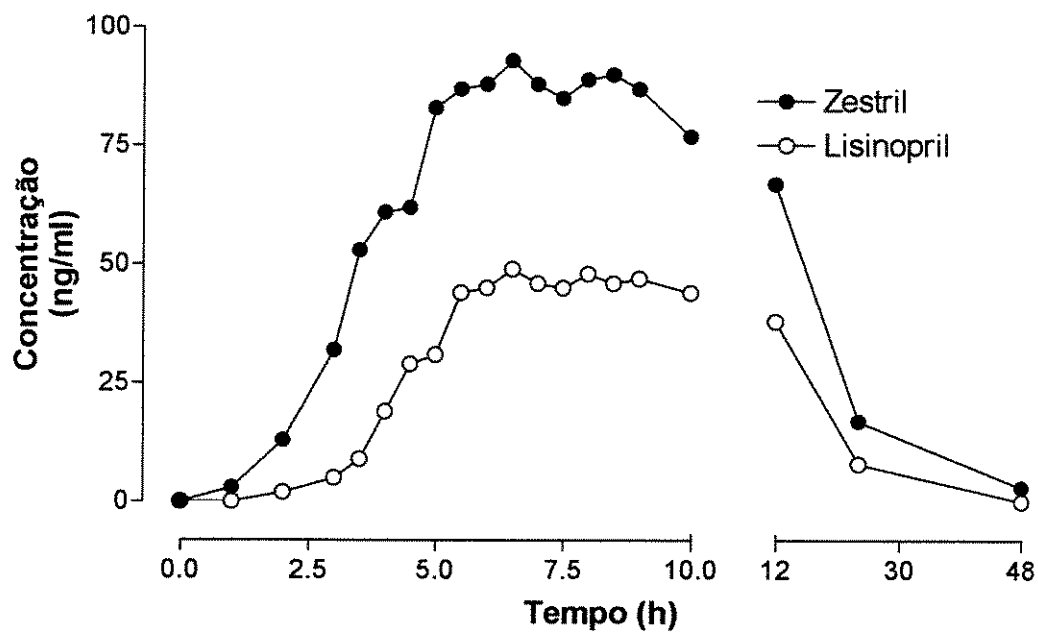
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1375	1986
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1394	2016
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,4	1,5
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1375	1986
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1481	2123
C _{max} (ng/mL)	132	184
T _{max} (h)	5,5	5,0
T _{1/2} (h)	6,7	6,9
K _e (1/h)	0,10	0,10

Vol II - AN270170M



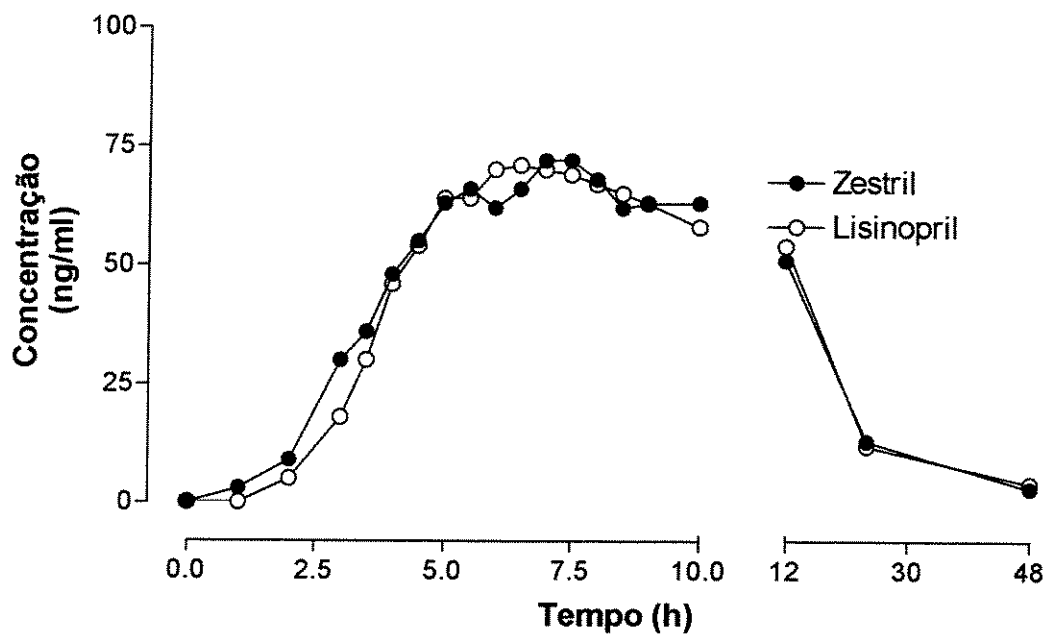
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1155	1246
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1177	1280
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,8	2,7
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1155	1246
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1251	1327
C _{max} (ng/mL)	88	94
T _{max} (h)	6,5	6,0
T _{1/2} (h)	7,5	8,1
K _e (1/h)	0,09	0,09

Vol III - AV010880M



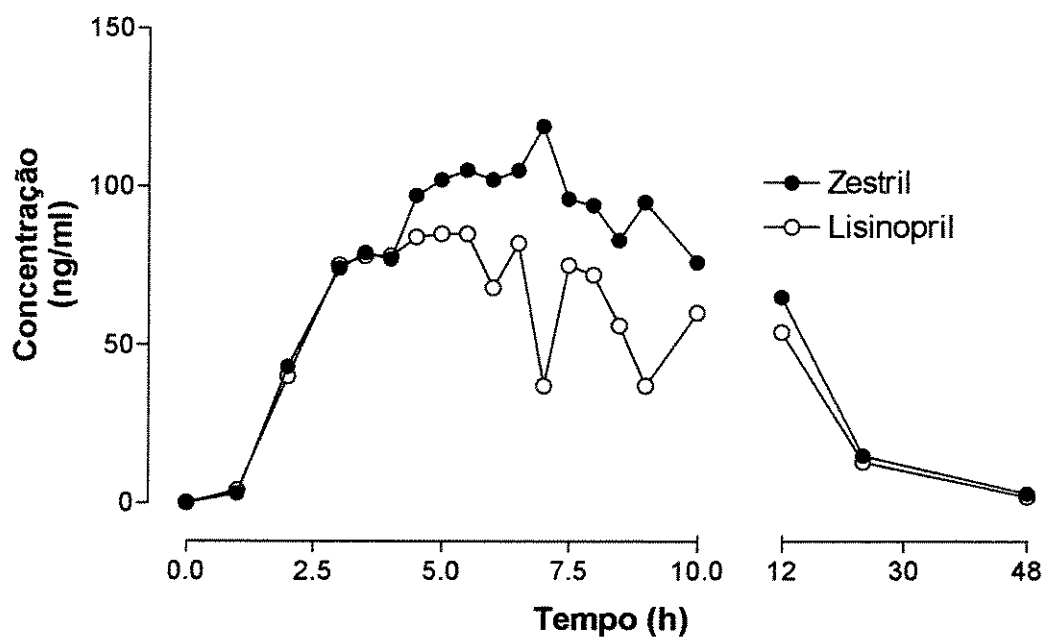
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	24	24
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1164	581
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1393	646
% AUC _{0-inf} extrapolado	16,4	9,9
T _{last} (h)	48	24
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1358	581
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1471	723
C _{max} (ng/mL)	93	49
T _{max} (h)	6,5	6,5
T _{1/2} (h)	8,1	5,6
K _e (1/h)	0,09	0,12

Vol IV - DS020762M



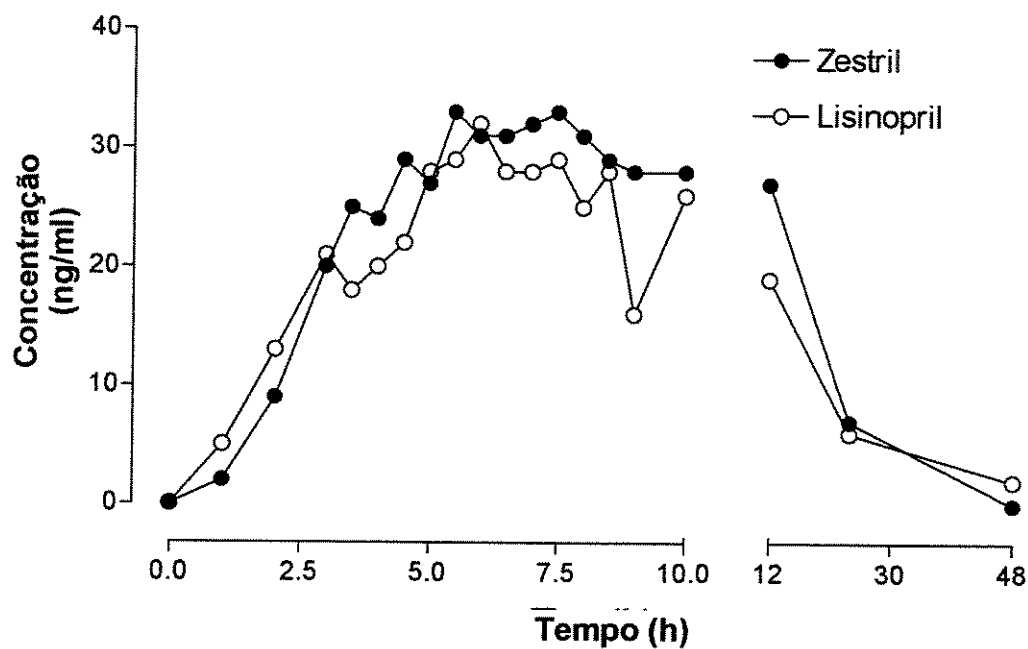
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1059	1052
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1096	1106
% AUC _{0-inf} extrapolado	3,4	4,9
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1059	1052
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1138	1130
C _{max} (ng/mL)	72	71
T _{max} (h)	7,0	6,5
T _{1/2} (h)	8,6	9,4
K _e (1/h)	0,08	0,07

Vol V - JS110576M

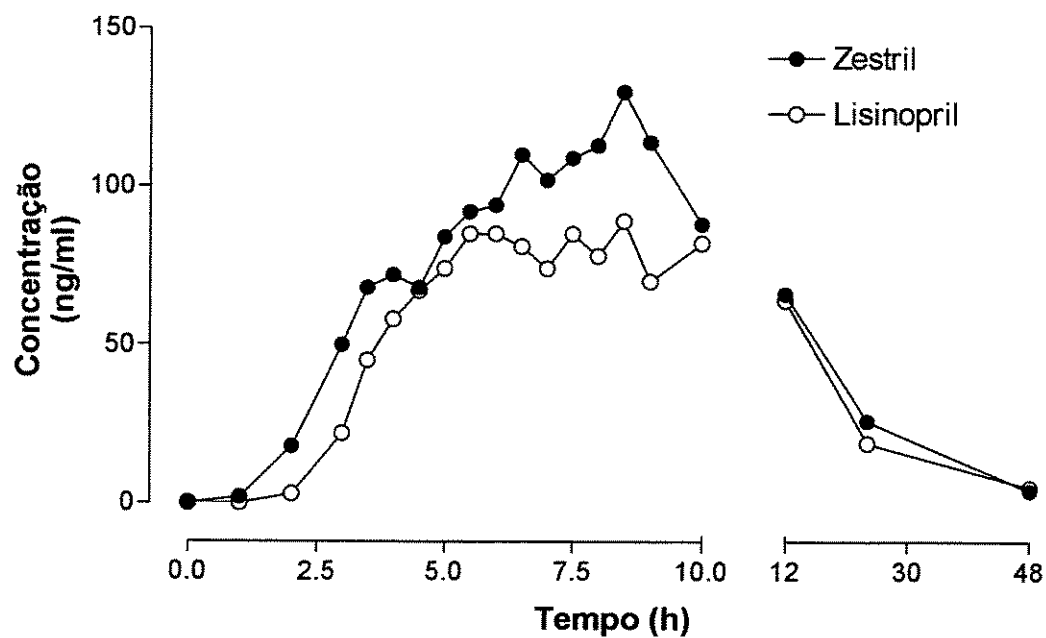


	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1468	1154
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1502	1176
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,2	1,9
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1468	1154
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1577	1254
C _{max} (ng/mL)	119	85
T _{max} (h)	7,0	5,0
T _{1/2} (h)	7,8	7,7
K _e (1/h)	0,09	0,09

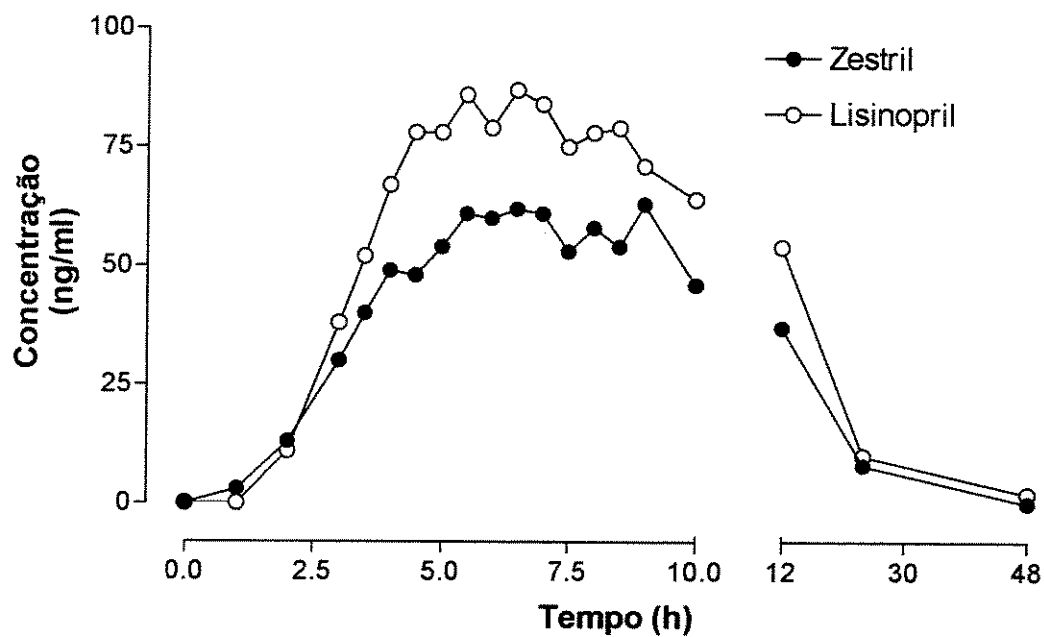
Vol VI - AR011274M



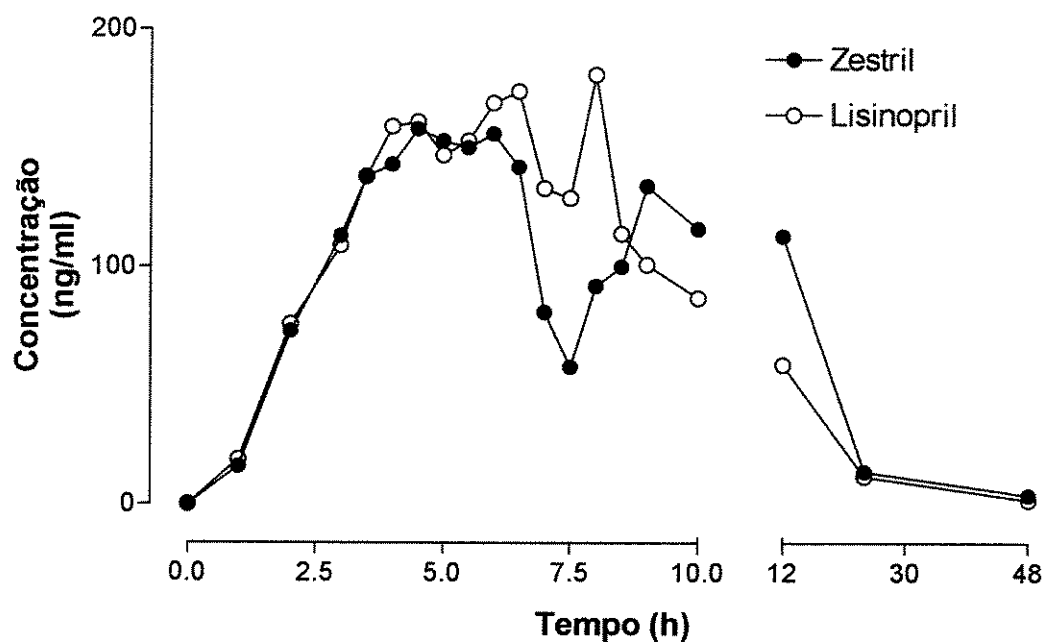
	Zestril®	Lisinopril
$T_{\text{pareado}} \text{ (h)}$	24	24
$ASC_{0-t} \text{ (pareado) } ([ng * h]/mL)$	456	381
$ASC_{0-inf} ([ng * h]/mL)$	524	499
% AUC_{0-inf} extrapolado	12,9	23,5
$T_{\text{last}} \text{ (h)}$	24	48
$ASC_{0-t} ([ng * h]/mL)$	456	469
$ASC_{0-48h} ([ng * h]/mL) \text{ - linear}$	567	493
$C_{\text{max}} \text{ (ng/mL)}$	33	32
$T_{\text{max}} \text{ (h)}$	5,5	6,0
$T_{1/2} \text{ (h)}$	6,7	10,4
$K_e \text{ (1/h)}$	0,10	0,07



	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1658	1365
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1709	1434
% AUC _{0-inf} extrapolado	3,0	4,8
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1658	1365
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1774	1456
C _{max} (ng/mL)	130	89
T _{max} (h)	8,5	8,5
T _{1/2} (h)	8,9	9,6
K _e (1/h)	0,08	0,07

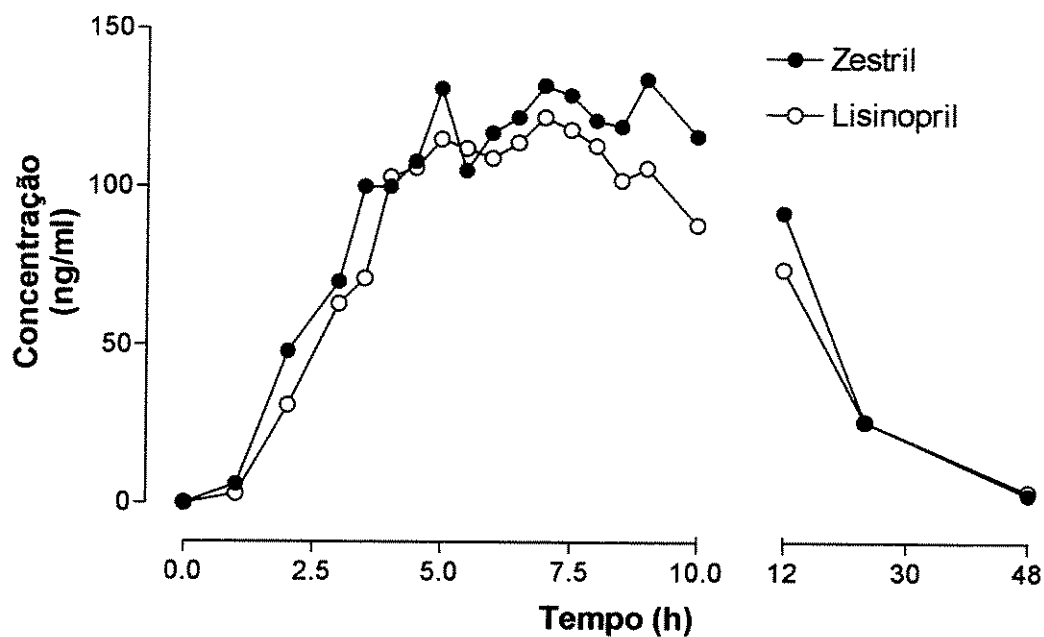


	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	24	24
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	718	977
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	782	1117
% AUC _{0-inf} extrapolado	8,1	12,6
T _{last} (h)	24	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	718	1096
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	858	1192
C _{max} (ng/mL)	63	87
T _{max} (h)	9,0	6,5
T _{1/2} (h)	5,5	7,4
K _e (1/h)	0,13	0,09

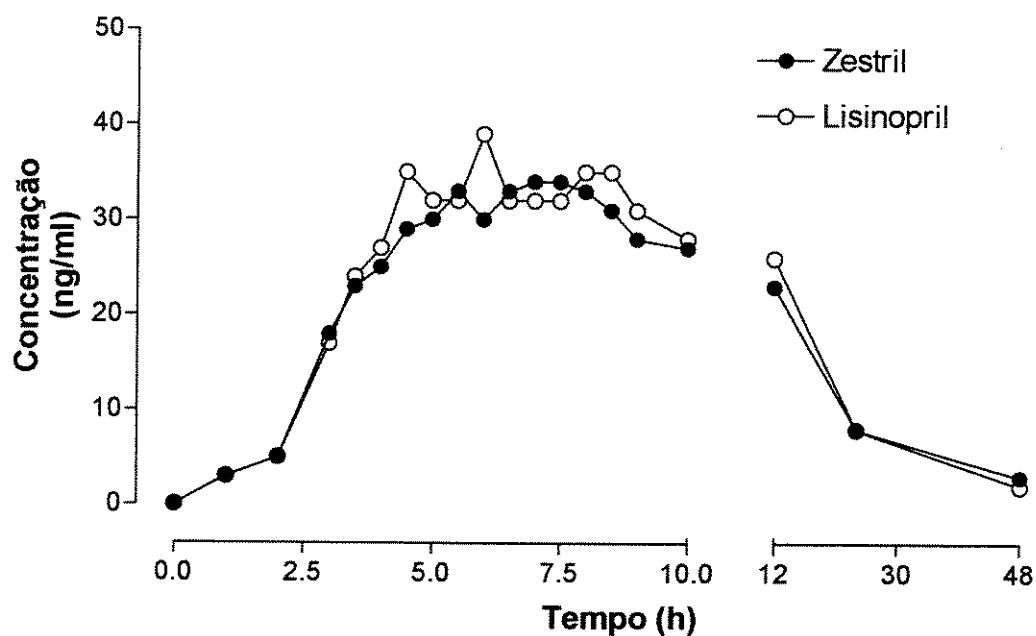


	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	2004	1756
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	2048	1775
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,1	1,1
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	2004	1756
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	2225	1865
C _{max} (ng/mL)	158	181
T _{max} (h)	4,5	8,0
T _{1/2} (h)	7,6	6,8
K _e (1/h)	0,09	0,10

Vol X - HE300370M

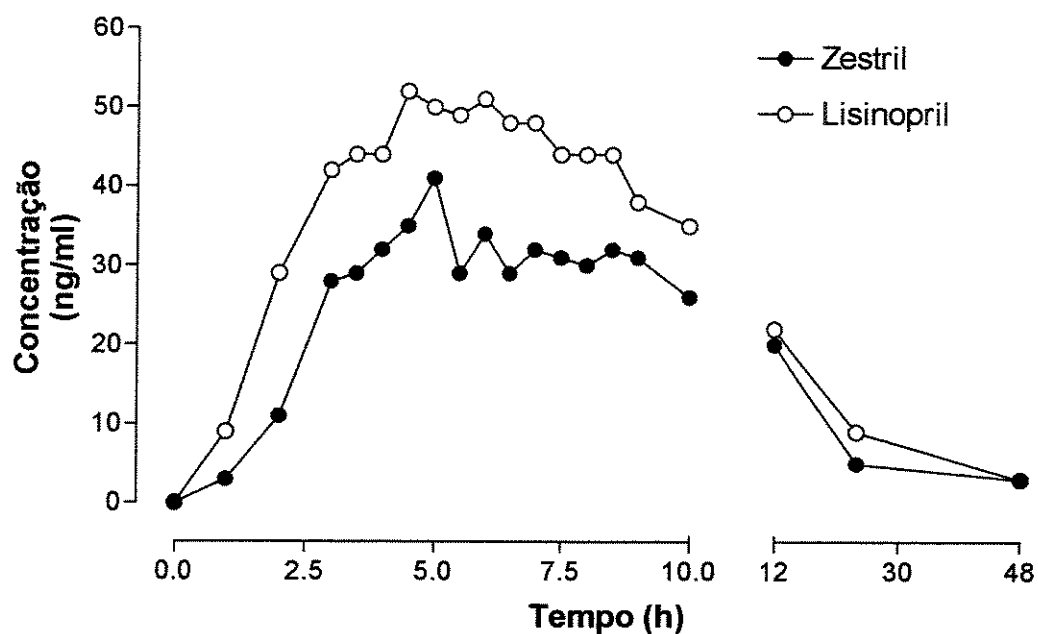


	Zestril®	Lisinopril
T_{pareado} (h)	48	48
ASC_{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1996	1791
ASC_{0-inf} ([ng * h]/mL)	2028	1840
% AUC_{0-inf} extrapolado	1,5	2,7
T_{last} (h)	48	48
ASC_{0-t} ([ng * h]/mL)	1996	1791
ASC_{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	2171	1919
C_{max} (ng/mL)	134	122
T_{max} (h)	9,0	7,0
$T_{1/2}$ (h)	7,2	8,5
K_e (1/h)	0,10	0,08



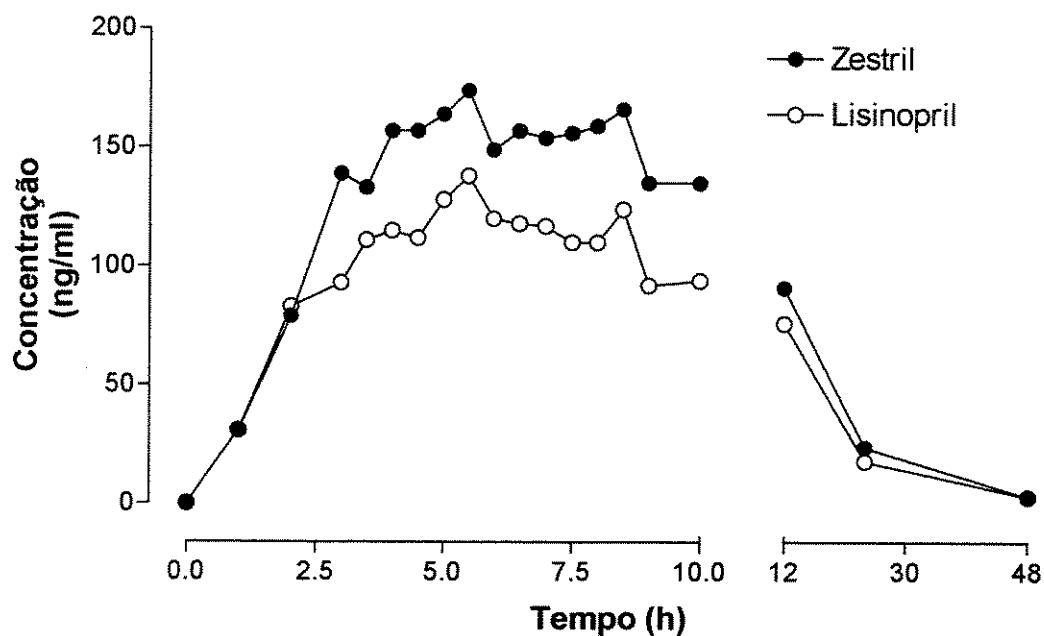
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	566	576
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	615	604
% AUC _{0-inf} extrapolado	7,9	4,6
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	566	576
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	592	614
C _{max} (ng/mL)	34	39
T _{max} (h)	7,0	6,0
T _{1/2} (h)	11,3	9,6
K _e (1/h)	0,06	0,07

Vol XII - WS180876M

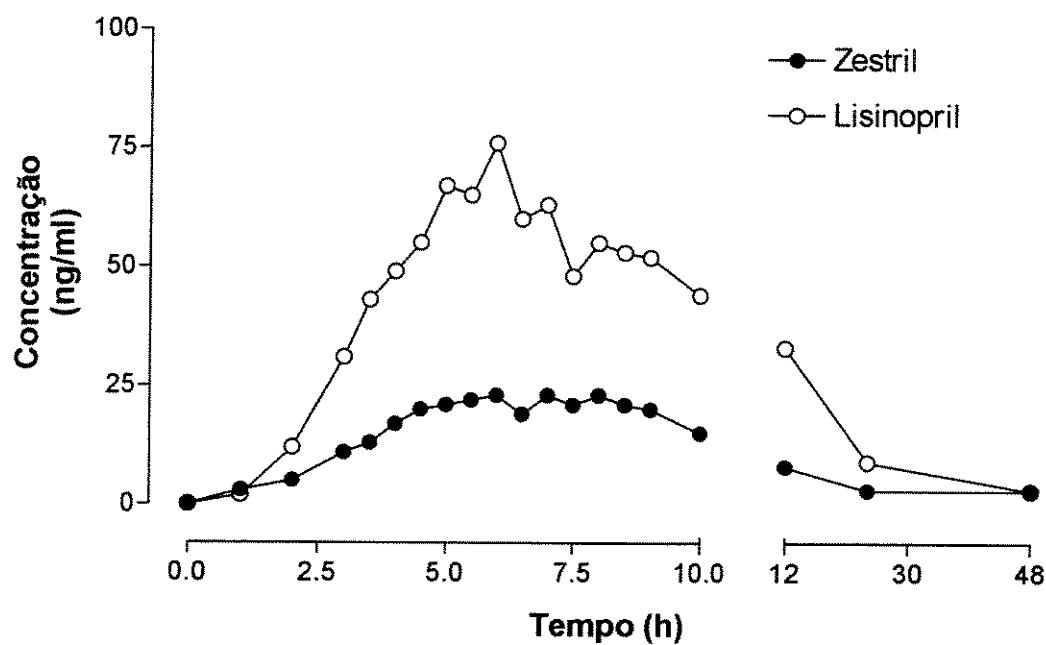


	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	517	736
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	565	792
% AUC _{0-inf} extrapolado	8,4	7,0
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	517	736
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	540	762
C _{max} (ng/mL)	41	52
T _{max} (h)	5,0	4,5
T _{1/2} (h)	10,9	12,8
K _e (1/h)	0,06	0,05

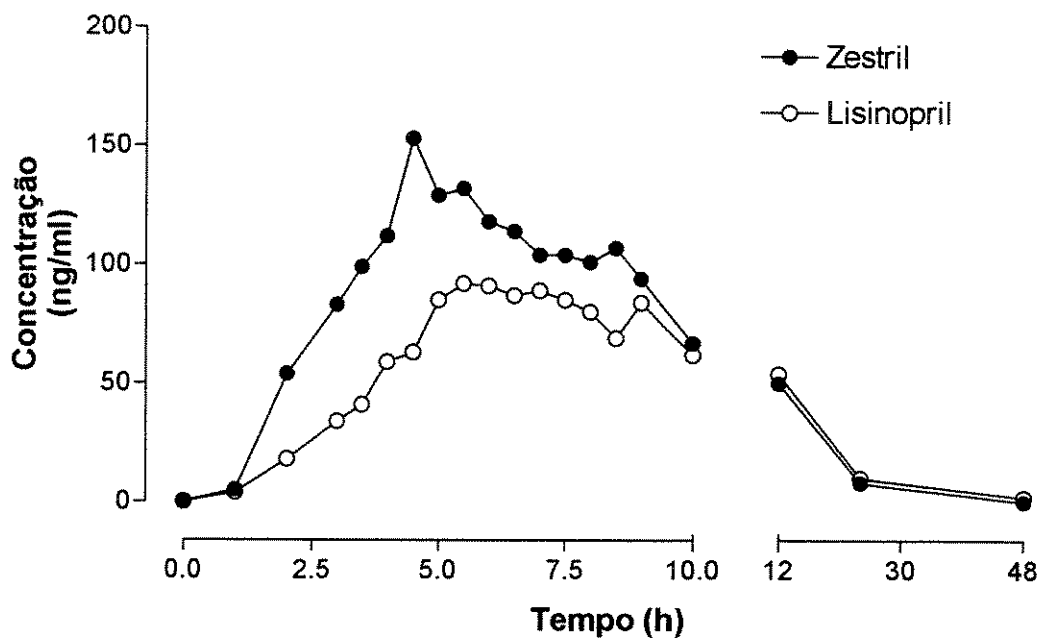
Vol XIII - JJ100167M



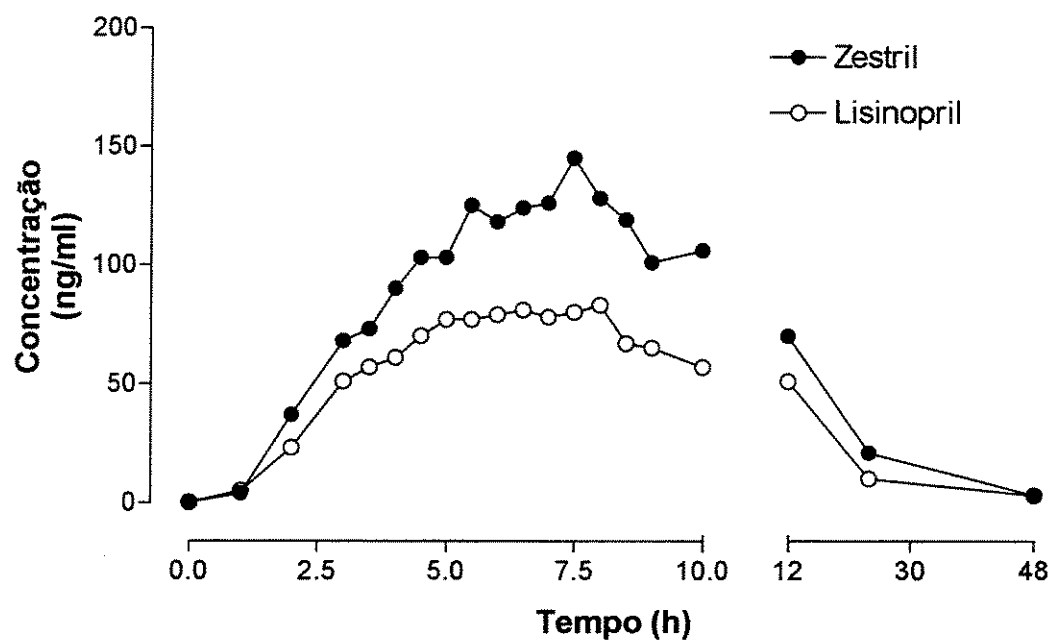
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	2314	1804
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	2346	1837
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,4	1,8
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	2314	1804
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	2486	1937
C _{max} (ng/mL)	174	138
T _{max} (h)	5,5	5,5
T _{1/2} (h)	7,4	7.5
K _e (1/h)	0,09	0,09



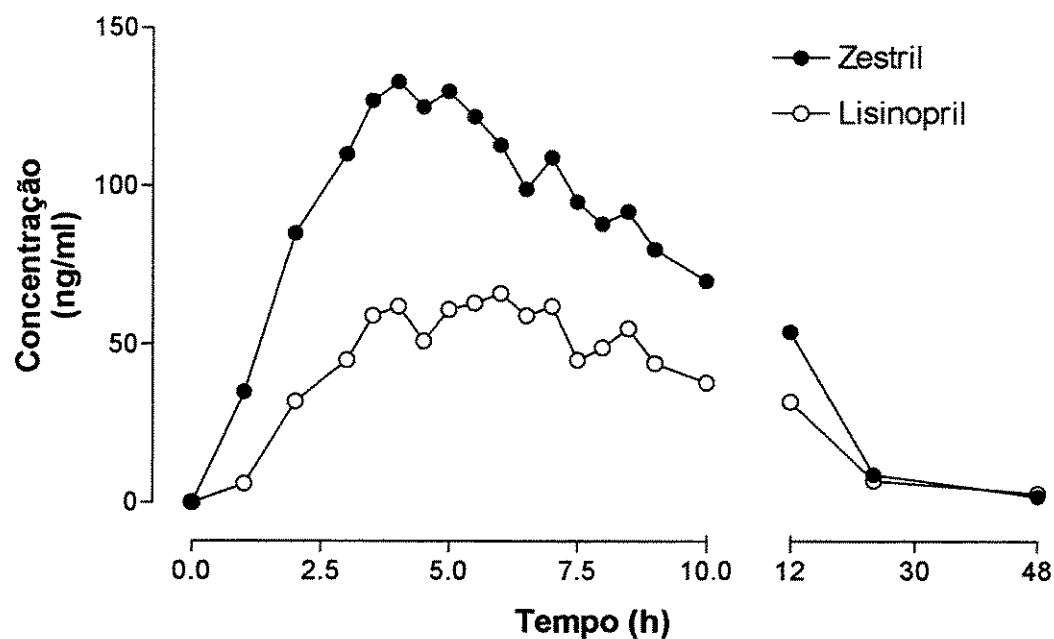
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	305	844
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	360	883
% AUC _{0-inf} extrapolado	15,1	4,4
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	305	844
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	311	888
C _{max} (ng/mL)	23	76
T _{max} (h)	6,0	6,0
T _{1/2} (h)	12,6	9,0
K _e (1/h)	0,06	0,08



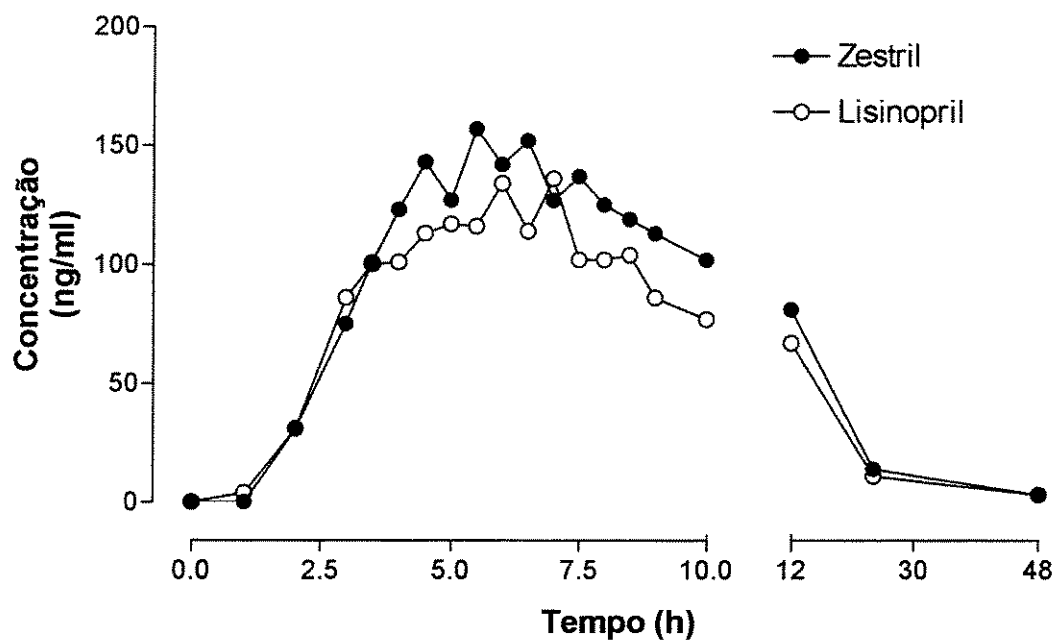
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	24	24
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1252	990
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1304	1130
% AUC _{0-inf} extrapolado	4,0	12,4
T _{last} (h)	24	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1252	1109
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1423	1206
C _{max} (ng/mL)	153	92
T _{max} (h)	4,5	5,5
T _{1/2} (h)	4,6	7,2
K _e (1/h)	0,15	0,10



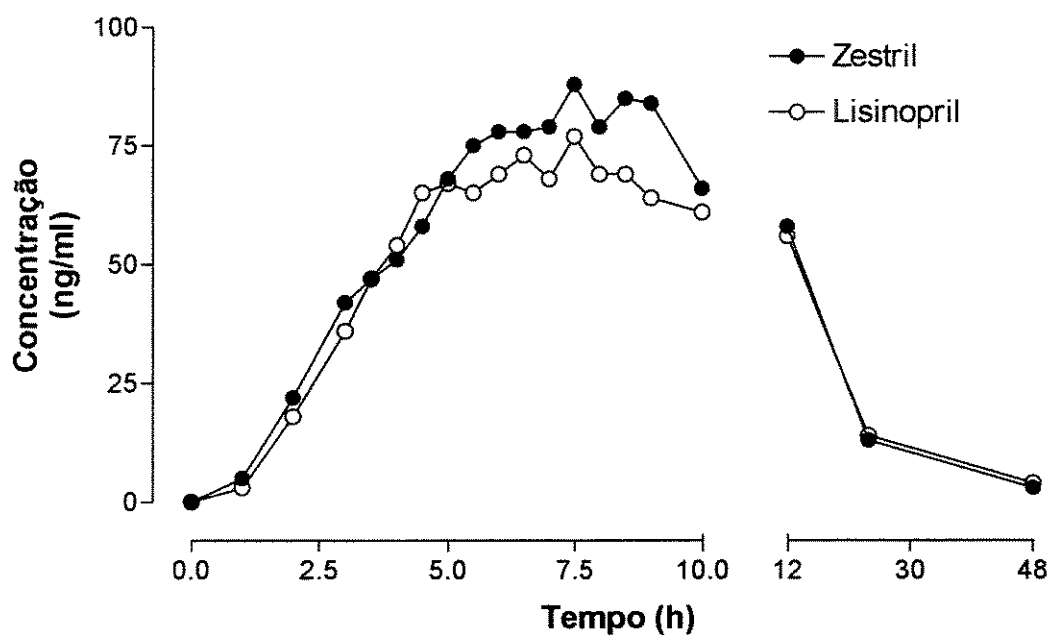
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1731	1098
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1766	1133
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,0	3,2
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1731	1098
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1858	1179
C _{max} (ng/mL)	145	83
T _{max} (h)	7,5	8,0
T _{1/2} (h)	8,0	8,3
K _e (1/h)	0,09	0,08



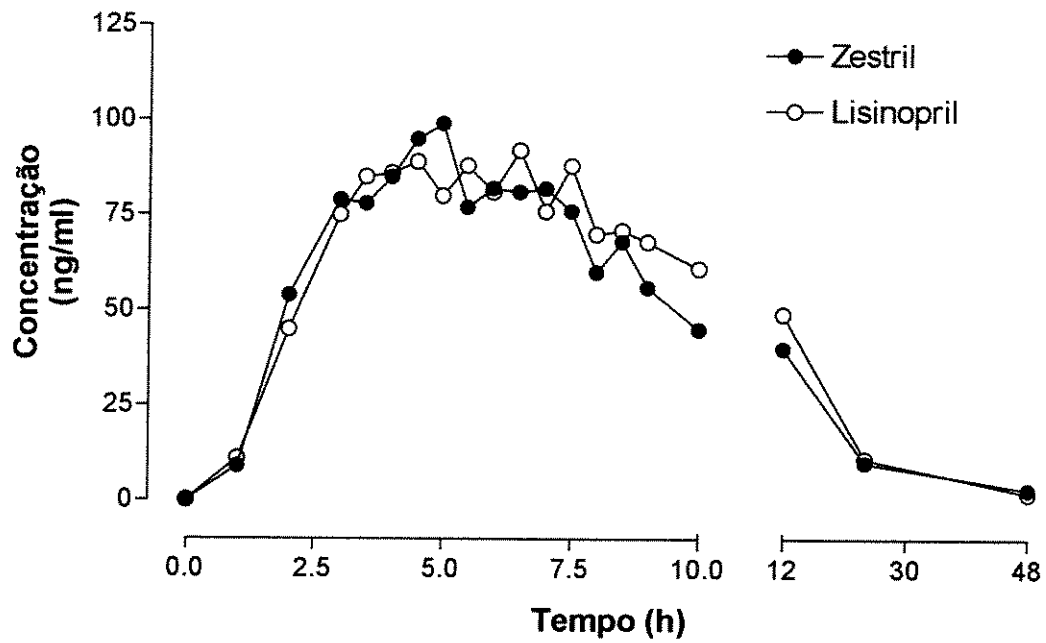
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t (pareado)} ([ng * h]/mL)	1450	820
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1470	859
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,3	4,5
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1450	820
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1,3	4,5
C _{max} (ng/mL)	1548	864
T _{max} (h)	133	66
T _{1/2} (h)	4,0	6,0
K _e (1/h)	6,8	9,0
T _{pareado} (h)	0,10	0,08



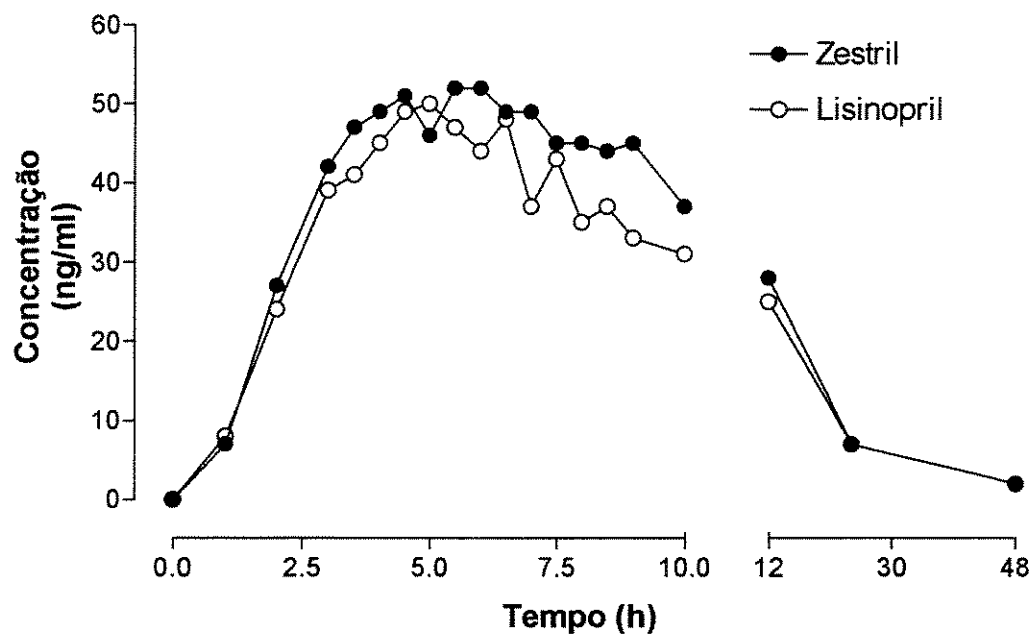
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1761	1485
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1791	1517
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,7	2,1
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1761	1485
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1907	1602
C _{max} (ng/mL)	157	136
T _{max} (h)	5,5	7,0
T _{1/2} (h)	7,1	7,4
K _e (1/h)	0,10	0,09



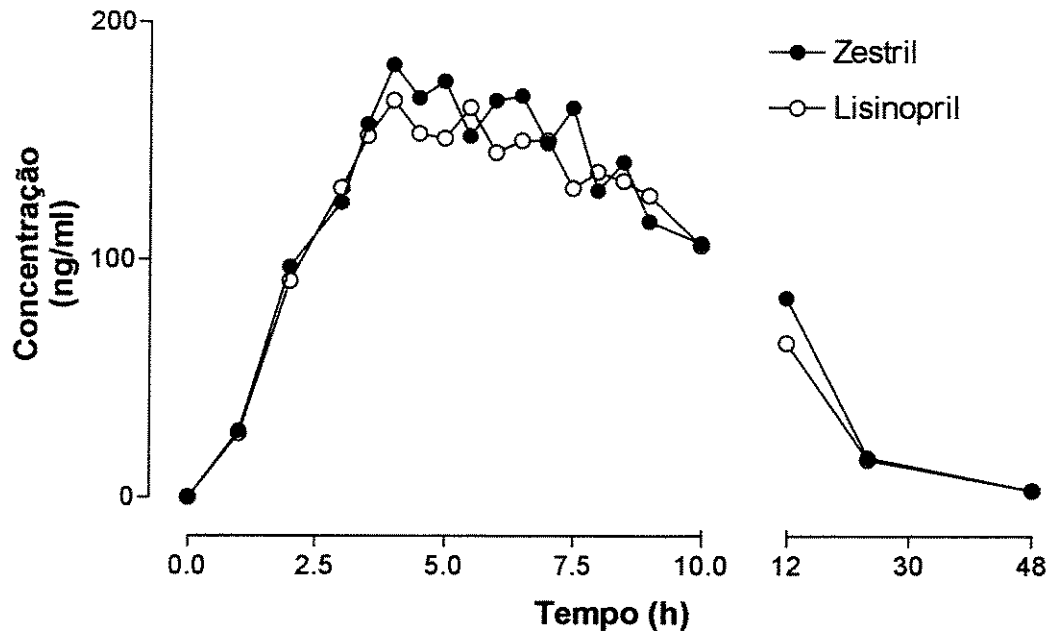
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1196	1160
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1231	1214
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,8	4,4
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1196	1160
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1290	1241
C _{max} (ng/mL)	88	77
T _{max} (h)	7,5	7,5
T _{1/2} (h)	8,1	9,4
K _e (1/h)	0,09	0,07



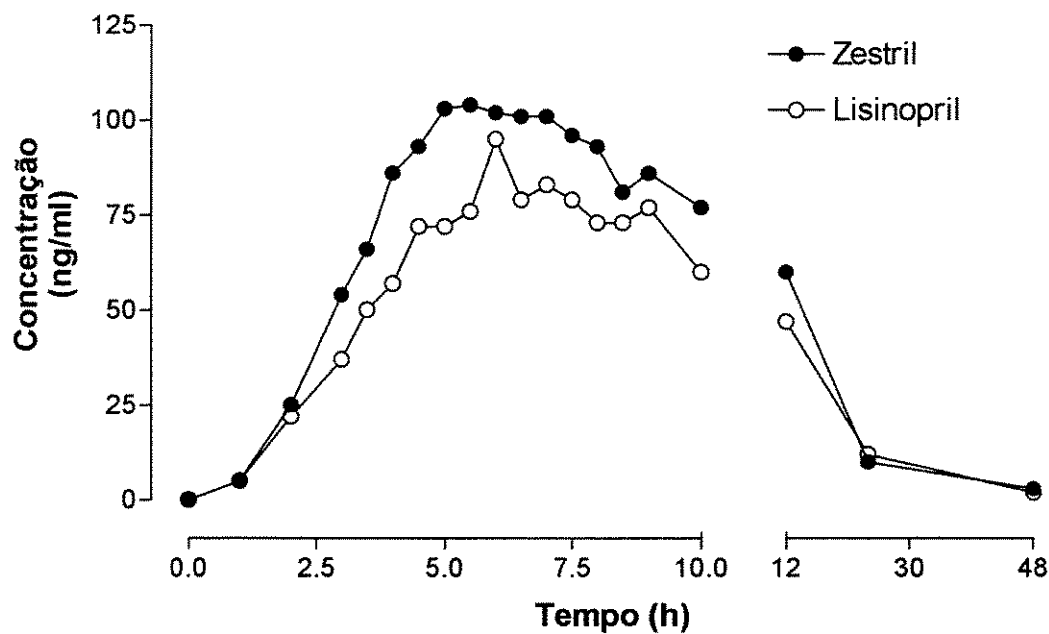
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1112	1188
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1148	1209
% AUC _{0-inf} extrapolado	3,1	1,8
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1112	1188
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	3,1	1,8
C _{max} (ng/mL)	1169	1273
T _{max} (h)	99	92
T _{1/2} (h)	5,0	6,5
K _e (1/h)	8,3	7,4
T _{pareado} (h)	0,08	0,09



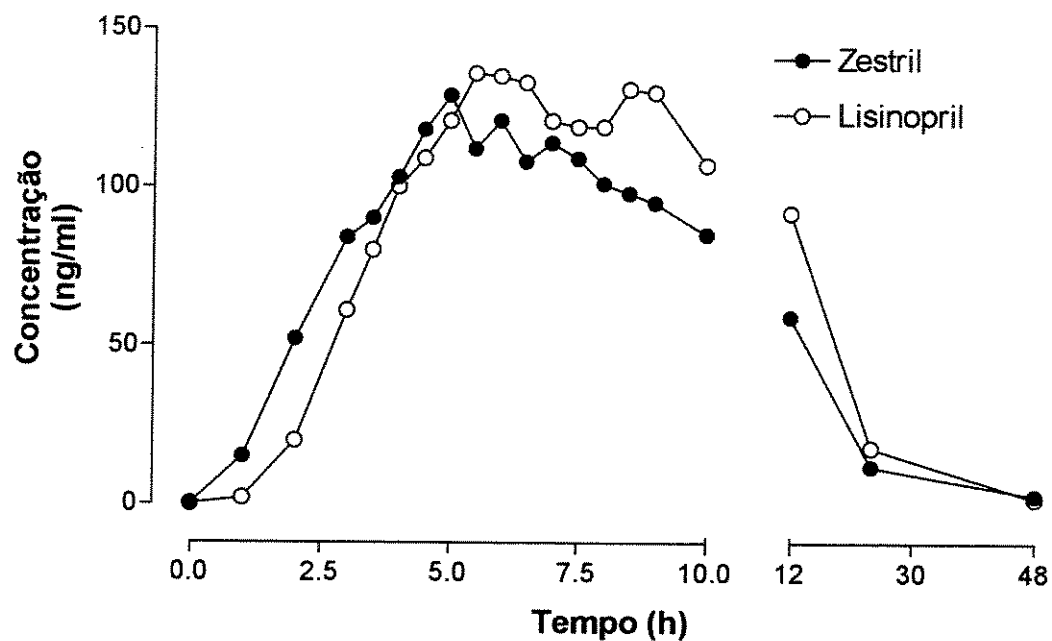
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	724	660
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	749	686
% AUC _{0-inf} extrapolado	3,3	3,8
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	724	660
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	765	696
C _{max} (ng/mL)	52	50
T _{max} (h)	5,5	5,0
T _{1/2} (h)	8,5	8,9
K _e (1/h)	0,08	0,08



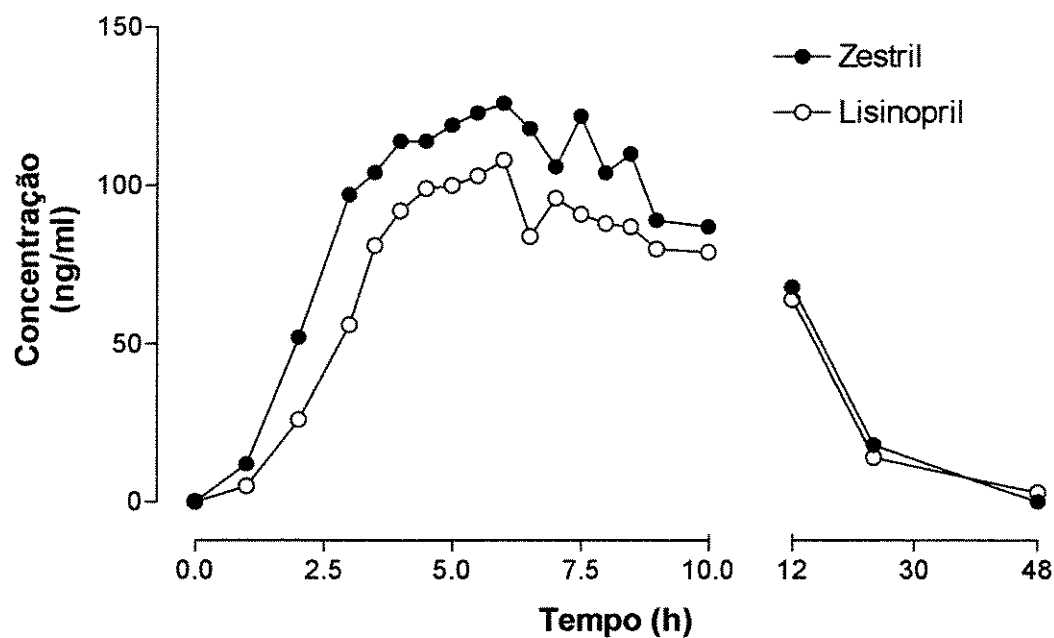
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	2121	1953
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	2151	1983
% AUC _{0-inf} extrapolado	1,4	1,6
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	2121	1953
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	2272	2065
C _{max} (ng/mL)	182	167
T _{max} (h)	4,0	4,0
T _{1/2} (h)	7,0	7,1
K _e (1/h)	0,10	0,10



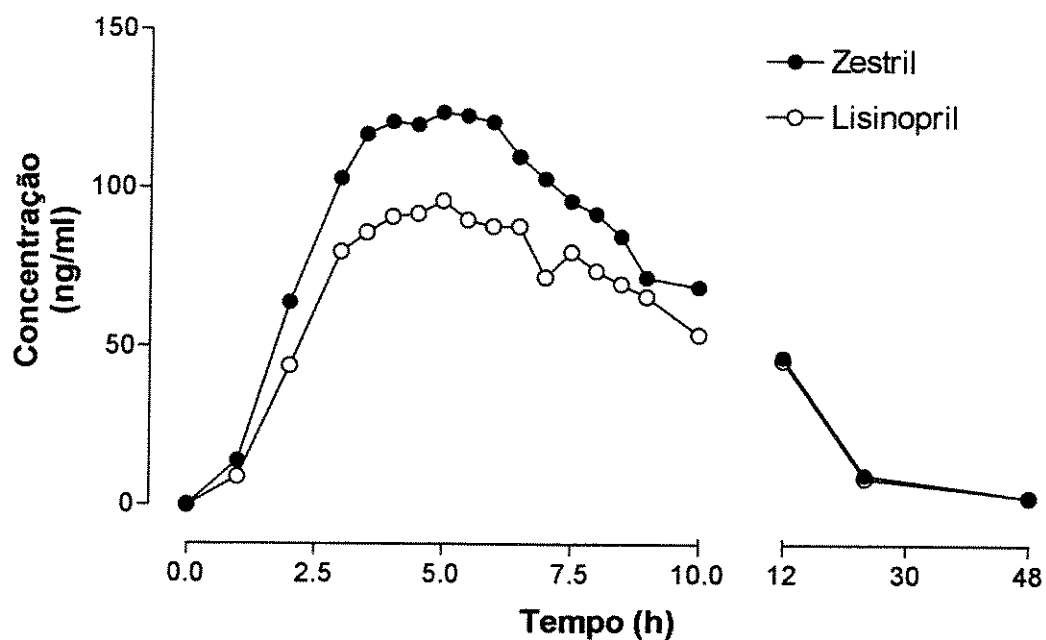
	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1297	1095
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1330	1116
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,5	1,9
T _{last} (h)	48	48
AUC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1297	1095
% AUC _{0-inf} extrapolado	2,5	1,9
AUC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1400	1176
C _{max} (ng/mL)	104	95
T _{max} (h)	5,5	6,0
T _{1/2} (h)	7,7	7,4
K _e (1/h)	0,09	0,09



	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t(pareado)} ([ng * h]/mL)	1497	1788
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1530	1807
% ASC _{0-inf} extrapolado	2,1	1,0
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1497	1788
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1595	1970
C _{max} (ng/mL)	129	136
T _{max} (h)	5,0	5,5
T _{1/2} (h)	7,5	6,5
K _e (1/h)	0,09	0,11

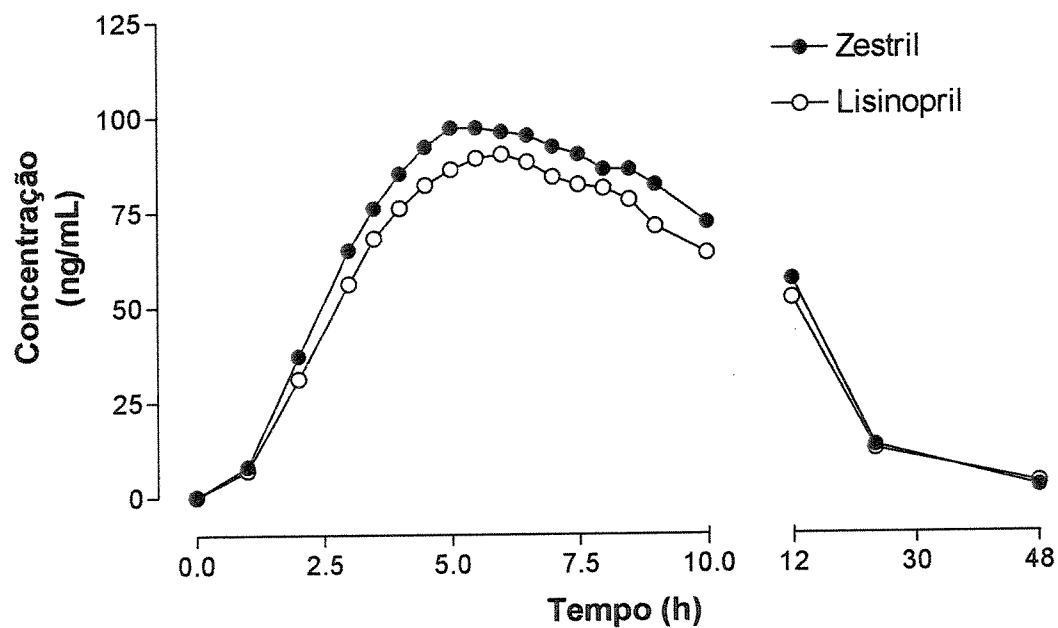


	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	24	24
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1482	1224
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1643	1430
% ASC _{0-inf} extrapolado	9,8	14,4
T _{last} (h)	24	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1482	1395
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1764	1502
C _{max} (ng/mL)	126	108
T _{max} (h)	6,0	6,0
T _{1/2} (h)	6,2	8,0
K _e (1/h)	0,11	0,09



	Zestril®	Lisinopril
T _{pareado} (h)	48	48
ASC _{0-t} (pareado) ([ng * h]/mL)	1391	1156
ASC _{0-inf} ([ng * h]/mL)	1423	1191
% ASC _{0-inf} extrapolado	2,3	2,9
T _{last} (h)	48	48
ASC _{0-t} ([ng * h]/mL)	1391	1156
ASC _{0-48h} ([ng * h]/mL)- linear	1464	1227
C _{max} (ng/mL)	124	96
T _{max} (h)	5,0	5,0
T _{1/2} (h)	7,6	8,1
K _e (1/h)	0,09	0,09

Concentração Média



	Zestril®		Lisinopril	
	Média	DP	Média	DP
ASC _{0-t} ([ng*h]/mL)	1306	529	1206	1206
ASC _{inf} ([ng * h]/mL)	1349	525	1242	438
ASC _(0-48h) ([ng * h]/mL) - linear	1419	572	1295	471
C _{max} (ng/mL)	107	46	96	41
T _{1/2} (h)	7,8	1,7	8,2	1,5
	Mediana	(Faixa)	Mediana	(Faixa)
T _{max} (h)	5,5	(4,0 – 9,0)	6,0	(4,0 – 8,5)

4.5. Análise descritiva do parâmetro C_{max}

A análise descritiva de C_{max} para o medicamento referência e teste constam nas tabelas 10 e 12, do Apêndice I, respectivamente. A figura 9, a seguir, mostra graficamente a tendência das médias de C_{max} dos 26 voluntários, para as duas formulações. Na tabela 2, segue a ANOVA para $\ln(C_{max})$.

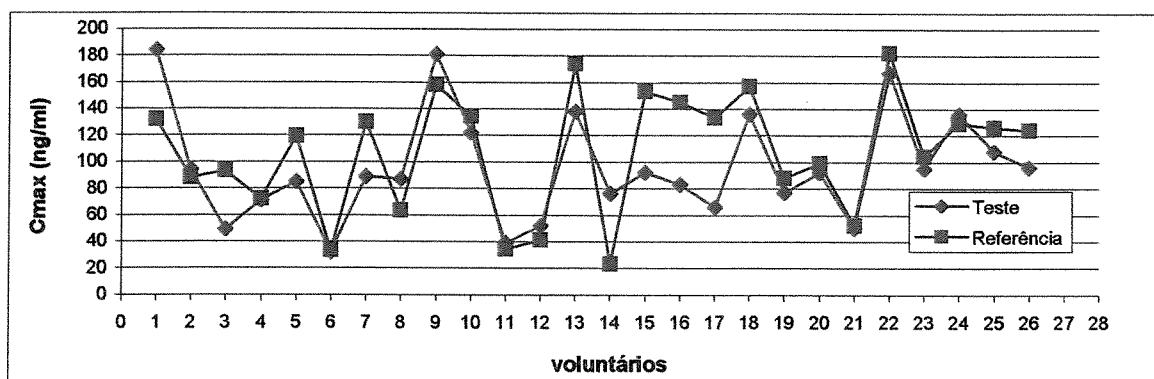


Figura 9: C_{max} por voluntário nas formulações R e T.

. Análise de ANOVA para o parâmetro C_{max}

Tabela 2: ANOVA para $\ln(C_{max})$ – tipo 3

	GL	SQ	QM	F	Valor-p
Seqüência	1	0,0099578	0,0099578	0,14	0,7107
Sujeito (seqüência)	24	11,2080704	0,467003	6,61	0,0001
Formulação	1	0,0761809	0,0761809	1,08	0,3095
Período	1	0,0707985	0,0707985	1,00	0,3269
Resíduo	24	1,6961354	0,0706723		

. Poder do teste considerando a variabilidade apresentada pelo parâmetro C_{max} foi de 83 %

4.6. Análise descritiva de ASC_{0-t}

A análise descritiva de ASC_{0-t} referente às formulações referência e teste foi apresentada nas tabelas 10 e 12, respectivamente. A figura 10, a seguir, mostra graficamente a tendência das médias de ASC_{0-t} dos 26 voluntários, para as duas formulações.

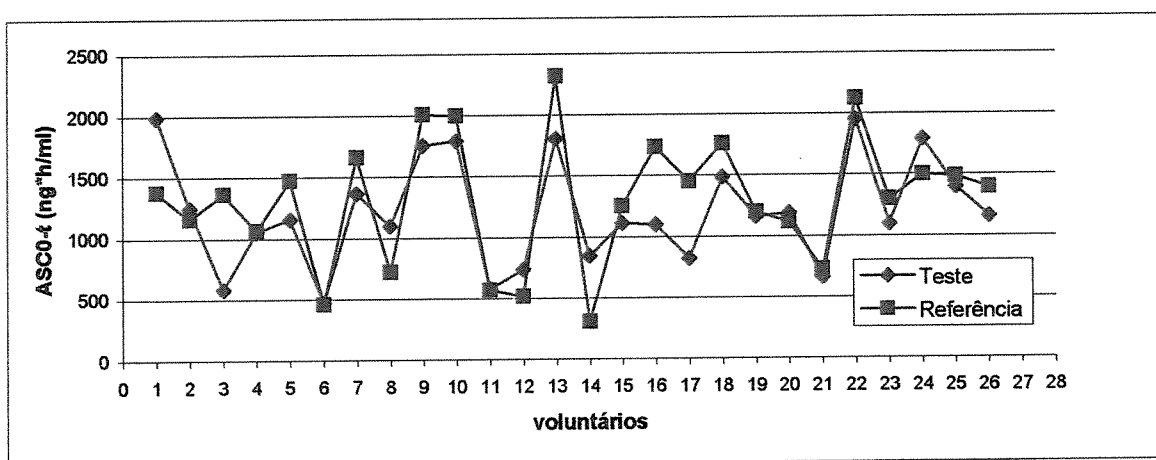


Figura 10: ASC_{0-t} por voluntário nas formulações R e T.

. Análise de ANOVA para o parâmetro ASC_{0-t}

Tabela 3: ANOVA para ln (ASC_{0-t}) – tipo 3

	GL	SQ	QM	F	Valor-p
Seqüência	1	0,0285200	0,0285200	0,47	0,4999
Sujeito (seqüência)	24	8,9233879	0,37180	6,12	0,0001
Formulação	1	0,0274184	0,0274184	0,89	0,3544
Período	1	0,0541934	0,0541934	0,45	0,5082
Resíduo	24	1,4584565	0,0607690		

. Poder do teste considerando a variabilidade obtida no parâmetro ASC_{0-t} foi de 88%.

4.7. Análise de t_{max}

Foi feita a análise não paramétrica de t_{max} e o ponto estimado para as diferenças individuais (Lisinopril/Zestril®) foi 0,06 h (I.C. de 90 % de - 0,4 a 0,5 h).

A análise descritiva de T_{max} referente às formulações referência e teste foi apresentada nas tabelas 10 e 12, dos valores de T_{max} dos 26 voluntários, para as duas formulações. Na figura 11 está demonstrado, graficamente, a diferença pontual entre T e R, quanto ao parâmetro t_{max} .

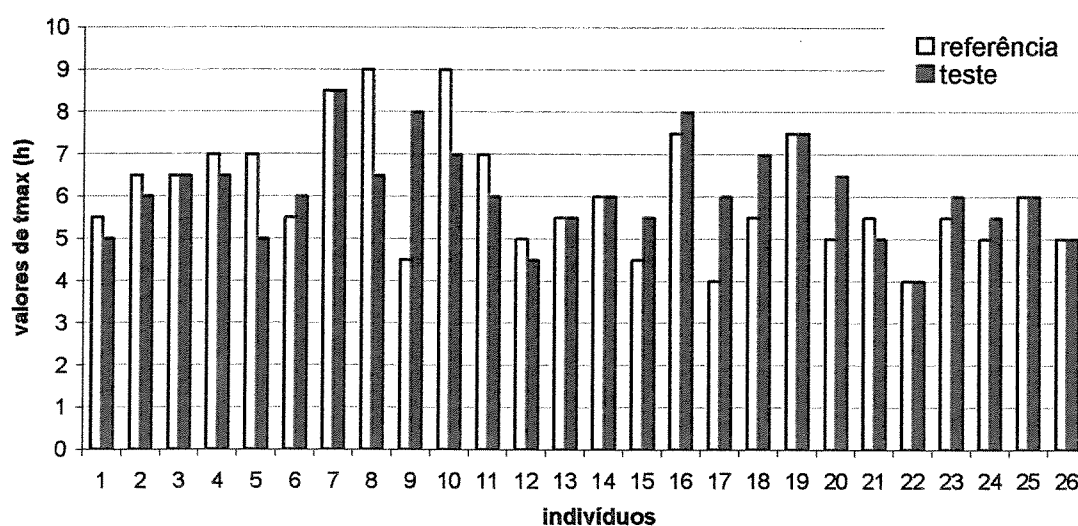


Figura 11: Comparação gráfica entre R e T, considerando o parâmetro T_{max} .

4.8. Intervalo de confiança de 90 % pela Bioequivalência Média

Tabela 4: Intervalo de Confiança de 90 % para os parâmetros C_{max} e ASC_{0-t} , pelo critério de Bioequivalência Média

Parâmetros Farmacocinéticos	IC 90 %
C_{max} (T/R)	92,6 (81,7 – 105,1)
ASC_{0-t} (T/R)	95,5 (85,0 – 107,4)

5.1. Metodologia analítica empregada

O lisinopril foi quantificado por várias técnicas, como por exemplo: bioensaio através da inibição da enzima conversora de angiotensina (SAENZ CAMPOS *et al.*, 1986), fluoroimunoensaio *time-resolved* (YUAN e GILBERT, 1996) e a grande maioria dos estudos encontrados utilizaram a técnica de radioimunoensaio (WORLAND, 1986; LANCASTER, S. G. & TODD, P. A. , 1988; BELISSANT *et al.*, 1996; JOHNSTON, D. *et al.*, 1987; VANDENBURG *et al.*, 1988).

A determinação da atividade da ECA como indicadora da concentração plasmática de inibidores da ECA não é muito adequada uma vez que o grau de inibição não é paralelo aos níveis do fármaco no sangue (RIBEIRO *et al.*, 1996). Desta forma, esta técnica não é adequada para estudos de bioequivalência pois poderia estimar a curva de biodisponibilidade por concentrações “irreais”. O radioimunoensaio é uma técnica muito sensível (0,2 – 0,4 ng/ml), entretanto, os marcadores requeridos geralmente não estão disponíveis comercialmente, dificultando o seu uso pelos pesquisadores. A cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do lisinopril somente foi descrita para mensurar este fármaco em amostras de matéria prima e formulações farmacêuticas, onde as concentrações do ativo encontradas são bastante altas (EL-GINDY *et al.*, 2001, BONAZZI, 1997). Um método de quantificação de lisinopril na urina por HPLC foi descrito por WONG *et al.* (1995). Entretanto, o limite de quantificação (LQ) foi de 0,5 µg/ml, que é uma concentração bem superior às concentrações plasmáticas encontradas após administrações de doses terapêuticas de lisinopril (< 100 ng/ml). Dessa maneira, até o momento, não se conhece método de determinação de níveis plasmáticos de lisinopril em estudos de farmacocinética por HPLC.

Recentemente, foram descritas as técnicas de quantificação de lisinopril em soro e plasma baseadas na cromatografia gasosa com ionização química negativa acoplada à espectrometria de massas (LEIS, *et al.*, 1998; LEIS, *et al.*, 1999) e na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS/MS) (TSAKALOF *et al.*, 2003). Ambos os métodos foram bem sucedidos na quantificação de lisinopril nestas matrizes biológicas.

Neste presente trabalho o método utilizado foi rápido, sensível e seletivo para mensurar lisinopril nas amostras de plasma. Foi o primeiro a ser reportado usando HPLC/MS/MS para a determinação de lisinopril no plasma. As vantagens deste método são inerentes à alta seletividade da espectrometria de massas (KOSTIAINEN *et al.*, 2003) e a alta sensibilidade observada (2,0 ng/ml quando comparado ao LQ de 6.0 ng/ml anteriormente descrito por TSAKALOF *et al.*, 2003). O menor tempo de retenção, tanto para o analito quanto para o padrão interno, também permitiu a quantificação de um grande número de amostras em curto espaço de tempo, característica importante em estudos de bioequivalência, onde o número de amostras a serem quantificadas é bastante alto.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica empregada, foram levadas em consideração as características físico-químicas do lisinopril. Primeiramente definiu-se qual seria o padrão interno a ser utilizado. Foi escolhido o enalaprilato como padrão interno por se tratar de uma substância com bastante similaridade química com o lisinopril, disponível comercialmente e que atende às finalidades analíticas propostas. A técnica de obtenção do fármaco das amostras de plasma, considerada mais adequada, foi a extração em fase sólida. Apesar do custo relativamente alto, é a técnica recomendada para compostos altamente polares, como é o caso do lisinopril. A coluna de extração utilizada (Oasis HLB®) possui grupos hidrofóbicos e também hidrofílicos, específicos para a captura de compostos polares. Esta técnica é capaz de fornecer resultados reprodutíveis, amostras mais limpas e maior recuperação, quando comparadas com outras técnicas como extração líquido-líquido e precipitação protéica. A extração líquido-líquido, que é uma técnica muito utilizada em estudos de farmacocinética, principalmente pelo seu baixo custo e sua eficiência, é extremamente complexa e inviável para a extração de compostos polares, pois requer muitas etapas de extração e, na maioria das vezes, não fornece boa recuperação. Não foram encontradas metodologias utilizando extração líquido-líquido e precipitação protéica para extrair lisinopril presente em sangue ou plasma. Foi descrita por Seki T. *et al.*, em 1997, a extração inicial de lisinopril presente na urina por extração líquido-líquido, com acidificação da amostra. Porém, posteriormente, foi realizada a extração em fase sólida. Nos demais estudos encontrados, todos os métodos analíticos que descrevem a extração de lisinopril em líquidos biológicos, a técnica de extração utilizada foi a extração em fase sólida.

Após a extração dos ativos da matriz biológica, a separação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS/MS), respectivamente. O sistema de HPLC/MS/MS, com monitoramento de reações múltiplas, é uma técnica altamente seletiva e sensível para mensurar quantidades ínfimas de substâncias presentes em matriz complexa. Foi utilizada fase reversa pela compatibilidade deste sistema ao espectrômetro de massas. Para definir os íons que seriam monitorados, do analito e do padrão interno, fez-se o espectro total ("modo scan") das moléculas de lisinopril e enalaprilato protonadas $[M-H]^+$. Através da análise do espectro total, os íons mais abundantes foram selecionados e fragmentados. Simultaneamente, todos os parâmetros do equipamento foram escolhidos e ajustados. Dessa forma, os íons de maior abundância e melhor definição para as finalidades analíticas foram: $406 > 84$ para o lisinopril e $349 > 206$ para o enalaprilato. As figuras 3 e 4 demonstram as rotas propostas de fragmentação das moléculas. Todos os parâmetros definidos e validados objetivaram a combinação de resultados confiáveis em um menor tempo de análise. O tempo da corrida cromatográfica foi relativamente curto (6,5 minutos), quando comparado com outras técnicas disponíveis.

O método analítico foi devidamente validado pelos parâmetros de seletividade/especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, com uma recuperação média para o lisinopril e enalaprilato de 80,6 % e 77,7 %, respectivamente.

Nenhuma interferência significativa foi observada nos tempos de retenção do fármaco e do padrão interno (4,06 min e 4,17 min respectivamente), nas condições analisadas, conforme demonstrado nos cromatogramas apresentados na Figura 5.

O LQ validado foi de 2 ng/mL e foi suficiente para caracterização do perfil farmacocinético de todos os voluntários, atendendo o critério da ASC_{0-t} , ser de, no mínimo, 80 % da ASC_{inf} . No quadro 3 seguem os resultados da validação do LOQ. Na figura 6 encontra-se o cromatograma do LQ.

A faixa de linearidade validada (2,0 – 200 ng/ml) abrangeu todas as concentrações obtidas nas amostras do estudo. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,95 (0,998301). Segue, na figura 7, curva de calibração.

O método mostrou-se preciso e exato, intra e inter corridas analíticas, sendo a variação inferior a 15 % para todos os valores obtidos. A maior variação encontrada foi de 9,1 % (quadros 5 e 6).

Pelos resultados de estabilidade obtidos (resultados com coeficiente de variação inferiores a 15 %), comprovou-se a estabilidade do fármaco e do padrão interno (quando foi o caso) em todas as condições experimentais do estudo, nos recipientes e condições de armazenagem empregados (quadros 8 a 12).

5.2. Etapa clínica e estatística

Dos cinco voluntários que se queixaram de cefaléia, 3 foram durante o período de administração do medicamento teste e 2 no período de administração do medicamento de referência. Cefaléia é um dos eventos adversos de grande incidência resultante da administração de medicamentos contendo lisinopril, mesmo após uma única dose (LANCASTER e TODD, 1988; RUSH & MERRIL, 1987). Portanto, é possível que este evento tenha sido causado pelo fármaco lisinopril. Porém, nota-se que tal ocorrência não tem relação específica com as formulações, pois o evento ocorreu durante o período de administração das duas medicações, em proporções similares.

Como o objetivo do estudo era detectar diferenças entre formulações farmacêuticas no que se refere aos parâmetros relacionados à absorção do princípio ativo a partir de sua forma farmacêutica, o protocolo foi delineado com o intuito de obter um estudo capaz de eliminar, ou pelo minimizar, todos os fatores que não estavam relacionados à este processo em particular, de forma a permitir que se obtenham os parâmetros farmacocinéticos relevantes para a comparação estatística, visando a averiguação de bioequivalência.

Neste sentido, o plano experimental considerado mais adequado e aplicado no presente estudo foi do tipo aberto, aleatório, cruzado, de dois períodos, com intervalo entre os períodos de, no mínimo, sete meias vidas de eliminação do fármaco, dose única, 2 tratamentos, com 26 voluntários sadios (ambos os sexos), balanceado, em condições de jejum.

O delineamento cruzado foi para eliminar, ou pelo menos minimizar, os fatores relacionados ao indivíduo, uma vez que a formulação teste e formulação referência são comparadas no mesmo indivíduo.

Para a comparação de dois produtos, 2 períodos e 2 seqüências é um plano adequado para o objetivo do estudo.

O intervalo entre as internações deve compreender um período no qual garanta que o fármaco tenha sido eliminado da corrente sangüínea, evitando assim, o efeito residual. Na verdade, pelos conceitos básicos de farmacocinética, a eliminação total do fármaco ocorre após 10 meias vidas de eliminação. Porém, para estudos de bioequivalência, na prática 10 meias vidas é um tempo muito longo dependendo do fármaco, o que pode aumentar a probabilidade de desistência de voluntários do estudo, entre outros fatores. Desta forma, 7 meias vidas de eliminação já são suficientes para não acarretar efeitos residuais, visto que serão encontradas concentrações ínfimas do fármaco após este tempo. No caso do lisinopril, o intervalo proposto foi de 2 semanas, intervalo superior a 7 meias vidas de eliminação do fármaco.

A dose única (1 comprimido de 20 mg) é o esquema posológico de escolha para estudos de bioequivalência, uma vez que favorece a sensibilidade do teste para detectar diferenças do processo de absorção de formulações farmacêuticas, além de ser mais seguro aos voluntários, ter menor custo e requerer menor tempo de ensaio.

O número de voluntários escolhido foi próximo ao número recomendado pela legislação vigente da época, que estabelecia, geralmente 24 voluntários.

A população estudada foi composta por voluntários sadios tanto pela questão ética quanto para a obtenção de homogeneidade entre as pessoas avaliadas, considerando a alta variabilidade interindividual intrínseca, além de estar estabelecido pela ANVISA.

Mesmo que estudos já realizados tenham demonstrado que a biodisponibilidade do lisinopril não é afetada pela presença do alimento, o estudo foi realizado em jejum como precaução adicional para minimizar variáveis não interessantes à análise (BEERMAN, 1988; MONJAVERIAN et al, 1986).

A conduta adotada de todos os voluntários ingeriram a mesma dieta (alimentos e líquidos), nos mesmos horários, teve a finalidade de minimizar a possível interferência da dieta na farmacocinética, entre os voluntários, sendo mais uma ferramenta de padronização. Como as substâncias xantínicas alteram o metabolismo fisiológico, a dieta foi isenta destas substâncias.

Os tempos de coleta escolhidos no estudo foram baseados na meia vida de eliminação do fármaco e no valor previsto de C_{max} e t_{max} . É extremamente importante a escolha correta dos tempos de coleta, pois são eles que irão definir o formato da curva de biodisponibilidade e estimar mais precisamente o valor de C_{max} e ASC_{0-t} , utilizados no cálculo de bioequivalência. Recomenda-se que o tempo de coleta seja feito durante três a cinco meias vidas de eliminação para compreender a absorção total do fármaco e parte da eliminação no organismo. Como a meia vida de eliminação é de 12 horas, o tempo de coleta estipulado no estudo foi de 48 horas. Para determinar o número de coletas e o espaçamento entre elas, baseou-se no valor previsto t_{max} (entre 6 e 8 horas) (ULM et al, 1982; LANCASTER, 1988). Desta forma, perto do t_{max} previsto, o intervalo entre uma coleta e outra foi menor (a cada trinta minutos). Em termos éticos, não permite-se coletas adicionais desnecessárias, sem justificativa, do ponto de vista científico.

O tratamento estatístico empregado para a análise foi o recomendado pela ANVISA e mundialmente aceito (FDA, EMEA, Health Canada).

Os tempos de coleta de sangue utilizados foram adequados para caracterizar o perfil farmacocinético do fármaco, a partir das formulações testadas. A ASC_{0-t} de todos os voluntários, para as duas formulações, foram superiores a 90 % da ASC_{inf} (tabelas 13 e 14). Os valores de t_{max} encontrados no estudo estão condizentes com a maioria dos valores descritos de estudos já publicados para este fármaco (de 6 a 8 horas), o que favorece o aumento da credibilidade na precisão da estimativa pontual de C_{max} . Segundo os relatos encontrados nas referências bibliográficas pesquisadas, o pico máximo de concentração plasmática, para voluntários sadios ocorre por volta das 6 h após administração de doses de 10 e 20 mg (BEERMAN et al, 1986; BIOLLAZ et al, 1982; LANCASTER, 1988, LEES & REID, 1988; MILLAR et al, 1982; MOJAVERIAN et al, 1986; ULM et al, 1982). O valor médio de t_{max} entre as duas formulações foi próximo entre si (Zestril® foi de 5,5 h [4,0 – 9,0 h] e do medicamento teste Lisinopril foi de 6,1 h [4,0 – 8,5 h]). O efeito mínimo da droga é observado após 6 horas da administração (coincide com

t_{max}). O valor de t_{max} mais prolongado pode comprometer o tratamento inicial, uma vez que o início da ação poderá ser retardado.

O volume de sangue de cada amostra coletada foi de 6 ml. A quantidade requerida no método analítico, por amostra, foi de 0,5 ml de plasma. Desta forma, podia-se analisar a possibilidade de coleta de um volume de sangue menor, considerando ainda as possíveis reanálises. Com o tempo de coleta de 48 horas, utilizado no estudo, todos os voluntários, para ambas as formulações, apresentaram ASC_{0-t} superiores a 90 %, ou seja, no tempo de 48 horas, as quantidades do ativo são muito pequenas, próximas de 2 ng/ml. Desta forma, como sugestão para próximos estudos pode-se planejar a coleta de volumes de sangue menores que 6 ml até o tempo de 36 horas. Estas condutas reduzirá o volume de sangue total coletado e o tempo de participação do voluntário no estudo, sem interferir nos propósitos do estudo.

Não foi detectado efeito residual, evidenciando que o intervalo utilizado entre as internações foi adequado.

Dentre os efeitos de período, produto, sequência e voluntário dentro da sequência, analisados pela ANOVA (tabelas 2 e 3), tanto para C_{max} quanto para ASC_{0-t} , o único efeito significativo encontrado foi resultante do voluntário dentro da sequência (valor $p = 0,0001$). Este resultado indica a presença da variabilidade entre indivíduos, muito comum em estudos de farmacocinética. Embora o quadro de ANOVA mostre efeito não significativo para o produto, indicando igualdade nas médias das biodisponibilidades comparadas, este resultado não implica na bioequivalência entre elas, sendo necessário calcular o intervalo de confiança proposto.

O tamanho da amostra utilizado (26 voluntários) foi suficiente, uma vez que garantiu um poder estatístico superior a 80 % para os parâmetros farmacocinéticos utilizados no cálculo (C_{max} : 83 % e ASC_{0-t} : 88 %). Conforme estudos clínicos publicados, a absorção do lisinopril é altamente variável (6 a 60 %) (BEERMAN, 1988; PDR 2003; ULM et al, 1982). Esta variabilidade pode ser entendida pela própria estrutura química do fármaco. Como já mencionado, o lisinopril possui 4 valores de pK_a s, o que indica que trata-se de uma molécula que se fica, grande parte do tempo, ionizada. A proporção entre forma ionizada e não ionizada depende basicamente do pH do meio fisiológico. Considerando a faixa de pH no trato gastrointestinal de 1 a 8 e a variabilidade intrínseca de pH fisiológico intra e inter indivíduos, a absorção pode variar bastante de indivíduo

para indivíduo, ou até no mesmo indivíduo. A faixa de dosagem disponível hoje no mercado (2,5; 5,0; 10; 20; 30 e 40 mg) também é outro indicativo da alta variabilidade deste fármaco. Somado a todos estes fatores, em estudos com ratos, realizados por AMIDON, G.L. et al, em 1989, observou-se que a permeabilidade do lisinopril é concentração-dependente e parece estar relacionada a um mecanismo não-passivo via carreador peptídico. Esta característica poderia também explicar a alta variabilidade de absorção, uma vez que um componente endógeno (carreador) está envolvido no processo. Porém, contrariando todos estes fatores recém expostos, a variabilidade encontrada no presente estudo foi relativamente pequena (quadrado médio residual da ANOVA foi de 0,07373, para parâmetro mais variável C_{max}), uma vez que, com 26 voluntários já foi suficiente para garantir um poder estatístico acima de 80 %. Considerando dados adicionais médios obtidos posteriormente à este estudo, sobre a variabilidade de lisinopril, atualmente recomenda-se a inclusão de 32 voluntários para estudos de bioequivalência de formulações contendo lisinopril.

A maioria dos valores de concentrações plasmáticas obtidas, para as duas formulações, foi superior à concentração mínima eficaz (8-10 ng/ml). Após administração oral de comprimidos de 2,5 mg de lisinopril, que corresponde à dose mínima, a média das concentrações plasmáticas máximas atingidas foi de aproximadamente 10 ng/ml (JOHNSTON, D. & DUFFIN, D., 1992) Estudo demonstrou que a concentração de 14 ng/ml fornece 90 % de inibição da ECA (MOJAVARIAN, M. L. et al, 1986). A maioria das concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) estão compreendidas no intervalo de valores descrito nas referências bibliográficas pesquisadas, de 80 a 140 ng/ml, após dose única de 20 mg (tabelas 5 e 7) (ULM et al, 1988; LANCASTER & TODD, 1988). Os valores de C_{max} , após administração do medicamento teste, foram de 32 a 184 ng/ml. Para o medicamento referência, os valores de C_{max} foram de 23 a 182 ng/ml. Segundo estudos de BIOLLAZ et al, 1982; MILLAR et al, 1982; ULM et al, 1982, a média das concentrações plasmáticas máximas, em voluntários sadios, foi cerca de 40 ng/ml, em torno de 6 a 8 horas, após administração oral de comprimidos de 10 mg de lisinopril em voluntários sadios. Foi reportado que até a dose de 20 mg de lisinopril existe linearidade dose-resposta, extrapolando este valor de 40 ng/ml para a dose de 20 mg, encontra-se a concentração de 80 ng/ml.

Os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos para o fármaco lisinopril, encontrados no estudo, são próximos aos encontrados nas literaturas pesquisadas, após dose única de 20 mg, via oral. (SIMON, 1988; SWEETMAN, 2002).

Quanto à segurança do medicamento testado, comparado com o medicamento de referência Zestril®, o primeiro apresentou níveis plasmáticos médios sutilmente menores, evidenciando assim a improbabilidade de níveis plasmáticos tóxicos pelo uso do medicamento teste quando administrado adequadamente, segundo orientação médica, para a maioria da população. Adicionalmente, conforme já mencionado, trata-se de um fármaco de amplo índice terapêutico (USP DI, 1992).

Para a decisão de bioequivalência, todos os voluntários foram considerados no cálculo, pois não foram observados voluntários com características discrepantes do grupo e a análise foi baseada na Bioequivalência Média, conforme estabelecido no protocolo.

O medicamento teste foi considerado bioequivalente ao medicamento de referência, o que significa dizer que o mesmo é tão seguro e eficaz quanto o medicamento de referência, e pode ser, com este, intercambiável, na clínica médica.

Pelo presente estudo, conclui-se que o medicamento Lisinopril comprimido de 20 mg, fabricado pelo laboratório Medley S.A. Indústria Farmacêutica (lote LIC 06/01-1; validade: junho/03), é bioequivalente ao medicamento de referência Zestril® comprimido de 20 mg, fabricado pelo laboratório Astra Zeneca (lote A03534; validade: outubro/04), em termos de velocidade e extensão de absorção do fármaco lisinopril no organismo.

Referências Bibliográficas

7

AARONS, I. Population pharmacokinetics: theory and practice. **Br J Clin Pharmacol**, 32: 669-670, 1991.

AJAYI, A. A.; CAMPBELL, B. C.; KELMAN, A. W.; HOWIE, C.; MEREDITH, P. A.; REID, J. L. Pharmacodynamics and population pharmacokinetics of enalapril and lisinopril. **Int J Clin Pharm Res**, 6:419-27, 1985.

AMIDON, G. L.; FRIEDMAN, D. I. Intestinal absorption mechanism of dipeptide angiotensin converting enzyme inhibitors of the lysyl-proline type: lisinopril and SQ-29852. **J Pharm Sci**, 78: 995 – 998, 1989.

ANON: ACE-inhibitors: contraindicated in pregnancy. **WHO Drug Information**, 4:23, 1990.

BEERMAN, B, GOMEZ, H., TILL, A.; JUNGREN, I. L. Pharmacokinetics of lisinopril in healthy volunteers. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, 49 (Supl.5): 66, 1986.

BEERMAN, J. Pharmacokinetics of lisinopril. **Am J Med**, 85 (Supl.3B): 25-30, 1988.

BEGG, E. J.; BAILEY, R. R.; LYNN, K. L.; ROBSON, R. A.; FRANK, G. J.; OLSON, S. C. The pharmacokinetics of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with renal impairment. **J Hypert**, 7 (suppl. 5): S29-S32, 1989.

BELLISSANT, E.; CHAU, N. P.; GIUDICELLI, J. F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model relating lisinopril plasma concentrations to regional hemodynamic effects in healthy volunteers. **J Cardiovasc Pharmacol**, 28: 470-478, 1996.

BELZ, G. G., KIRCH, W., KLEINBLOESEM, C. H. Angiotensin-converting Enzyme inhibitors: relationship between pharmacodynamics and pharmacokinetics. **Clin Pharmacokinet**, 15: 295-318, 1988.

BIOLLAZ, J, SCHELLING, J. L., JACOT DES COMBES, B, BRUNNER, D. B., BRUNNER, H. R., DESPONDS, G. et al. Enalapril maleate and a lysine analogue (MK521) in normal volunteers: relationship between plasma drug levels and the renin angiotensin system. **Br J Clin Pharmacol**, 14: 363-368, 1982.

BOLZANO, K. et al. The antihypertensive effect of lisinopril compared to atenolol in patients with mild to moderate hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9 (suppl. 3): S43-S47, 1987.

BRASIL. **Decreto nº 3.181**, de 23 de setembro de 1999. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, e dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências.

BRASIL. Decreto nº 793, de 5 de abril de 1.993. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1999.

BRASIL. Lei 6.360, de 23 de setembro de 1.976: Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1976.

BRASIL. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regulamenta direitos e obrigações à propriedade industrial. **Diário Oficial da União**, 1996.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1999.

BRASIL. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1999.

BRASIL. **Resolução – RDC nº 133**, de 2 de junho de 2003. Estabelece o Regulamento Técnico para Medicamentos Similares.

BRASIL. **Resolução – RDC nº 135**, de 2 de junho de 2003. Estabelece o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Revoga a Resolução – RDC nº 84/02.

BRASIL. **Resolução – RDC nº 84**, de 20 de março de 2002. Estabele o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.

BRASIL. Resolução – RE nº 896, de 29 de maio de 2003. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 2 de junho de 2003.

BRASIL. Resolução – RE nº 898, de 29 de maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial da União**, 2 de junho de 2003.

BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2 de junho de 2003.

BRASIL. **Resolução nº 196**, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde.

BURNIER, M.; BIOLLAZ, J. Pharmacokinetic optimization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor therapy. **Clin Pharmacokinet**, 22: 375-384, 1992.

CAMERON, H. A.; HIGGINS, T. J. Clinical experience with lisinopril: observations on safety and tolerability. **J Human hyperten**, 3: 177-186.

CAMPOS, D. S.; BAYÉS, M. C.; MASANA, E.; MARTIN, S.; BARBANOJ, M.; JANE, F. Sex-related pharmacokinetic and pharmacodynamic variations of lisinopril. **Meth Find Exp Clin Pharmacol**, 18(8): 533-538, 1996.

CHINCHILLI, V. M.; ESINHART, J. D. Design and analysis of intra-subject variability in cross-over experiments. **Stat Med**, 15: 1619-1634, 1996.

CHOW, S. C.; LIU, J. P. D. **Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies**. New York: Marcel Dekker, 2000.

CIRILLO, V. J.; TILL, A. E.; GOMEZ, H. J.; SHITH, W. J.; THIEME, G. Effect of age on lisinopril pharmacokinetics: abstract nº B5. **Cical Pharmacology and Therapeutics**, 39: 187, 1986.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 21, part 320: bioavailability and bioequivalence requirements. 2002.

CUNNIFF C.; JONNES, K. L.; PHILLIPSON, J.; BENIRSCHKE, K.; SHORT, S.; WUJEK, J. Oligohydramnios sequence and renal tubular malformation associated with maternal enalapril use. **Am J Obstet Gynecol**, 162: 187-189, 1990.

DAWSON, A. H.; HARVEY D.; SMITH, A. J.. Lisinopril overdose. **Lancet**, 335: 487-488.

DICKSTEINS, K. Hemodynamic, hormonal, and pharmacokinetic aspects of treatment with lisinopril in congestive heart failure. **J Cardio Pharmacol**, 9 (suppl. 3): S87 – S81, 1987.

FDA, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Guideline for the study and evaluation of gender differences in the clinical evaluation of drugs. **Federal Register**, 58(139): 39406-39416.

GAUTAM P. C.; VARGAS, E.; LYE, M. Pharmacokinetics of lisinopril (MK521) in healthy young and elderly subjects and in elderly patients with cardiac failure. **J Pharm Pharmacol**, 39: 929-931, 1987.

GERÊNCIA GERAL DE INSPEÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS E CONTROLE DE PRODUTOS. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência**. Brasília: ANVISA, 2002.

GILES, T. D. ; KATZ, R. ; SULLIVAN, J. M. ; WOLFSON, P. ; HAUGLAND, M. ; KIRLIN, P. et al. Short and long acting angiotensin converting enzyme inhibitors: a randomized trial of lisinopril versus captopril in the treatment of congestive heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 13(6): 1240-1247, 1989.

GOMEZ H. J.; CIRILLO, V.J.; MONCLOA, F. The clinical pharmacology of lisinopril. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9 (suppl. 3): S27 – S34. 1987.

- GRUBBS, F. E. Procedures for deleting outlying observations in samples. **Technometrics**, 11(1), 1969.
- HARRIS, R. Z.; BENET, L. Z.; SCHWARTZ, J. B. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Drugs**, 50(2): 222-239, 1995.
- HAUCK, W. W.; PAREKH, A.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; WILLIAMS, R.W. What is the impact on bioequivalence studies? **Int J Clin Pharmacol Ther**, 39 (8): 350-355, 2001.
- HICHENS, M.M.; HAND, E. L.; MULCAHY, W.S. Radio-immunoassay for angiotensin converting enzyme inhibitors. **Ligand Q**, 4: 43, 1981.
- HILLS, M.; ARMITAGE, P. The two-period cross-over clinical trial. **Br J Clin Pharmac**, 8: 7-20, 1979.
- IZUMI, Y.; HONDA, M.; HATANO, M.; KAWAHARA, Y. Influence of food on the clinical effect of angiotensin I converting enzyme inhibitor (SQ14.255). **Tohoku J Exp Med**, 139(3): 279-286, 1983.
- JACKSON, E. K. Renin and Angiotensin. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.809-841.
- JOHNSTON, D.; DUFFIN, D. Pharmacokinetics profiles of single and repeat doses of lisinopril and enalapril in congestive heart failure. **Am J Cardiol**, 70: 151C-153C, 1992.
- KELLY, J. G.; DOYLE, G. D.; CARMODY, M.; GLOVER, D. R.; COOPER, W. D. P. Pharmacokinetics of lisinopril, enalapril and enalaprilat in renal failure: effects of haemodialysis. **Br J Clin Pharmacol**, 26: 781-786, 1988.
- KELLY, J.G.; O'MALLEY, K. Clinical pharmacokinetics of newer ACE inhibitors: a review. **Clin Pharmacokinet**, 19: 177-196, 1990.

LANCASTER, S. G.; TODD, P. A. Lisinopril: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. **Drugs**, 35: 646-669, 1988.

LEES, K. R.; REID, J. L. Lisinopril and nifedipine: no acute interaction in normotensives. **Br J Clin Pharmacol**, 25(3): 307-13, 1988.

LEES, K.R. The dose-response relationship with angiotensin converting enzyme inhibitors: effects on blood pressure and biochemical parameters. **J Hipertens**, 10 (Suppl. 5): S3-11, 1992.

LM, E. H.; HICHENS, M.; GOMEZ, H. J.; TILL, A. E.; HAND, E.; VASSIL, T. C. et. al. Enalapril maleate and lysine analogue (MK521): disposition in man. **Br J Clin Pharmacol**; 14:357-362, 1982.

METZLER, C.M. Bioavailability: a problem in equivalence. **Biometrics**, 30: 309-317, 1974.

MILLAR, J.; DERKX, F. H.; MCLEAN, K; REID, J. L. Pharmacodynamics of converting enzyme inhibition: the cardiovascular endocrine and autonomic effects of MK421 (enalapril) and MK 521. **Br J Clin Pharmacol**, 14(3): 347-355, 1982.

MOJATERIAN, P.; ROCCI, M. L., VLASSES, P. H., HOHOLICK, C., CLEMENTI, R. A.; FERGUSON, R. K. Effect of food on the bioavailability of lisinopril, a nonsulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. **J Pharmac Sci**, 75: 395-397, 1986.

MORLIN, C.; BAGLIVO, H.; BOEIJING, J. K.; BRECKENRIDGE, A.M.; CLEMENT, D.; JOHNSTON, G. D. et al. Comparative trial of lisinopril and nifedipine in mild to severe essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 9 (suppl. 3): S49 – S52, 1987.

POOL, J. L.; GENNARI, J.; GOLDSTEIN, R.; KOCHAR, M. S.; LEWIN, A. J.; MAXWELL, M. H. et al. Controlled multicenter study of the antihypertensive effects of lisinopril, hydrochlorothiazide, and lisinopril plus hydrochlorothiazide in the treatment of 394 patients with mild moderate essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9 (suppl. 3): S36-S42, 1987.

POWERS, E. W. R.; CHIRAMIDA, A.; DeMARIA, A.; GILES, T. D.; HACKSHAW, B.; HART, W. et al. A double-blind comparison of lisinopril with captopril in patients with symptomatic congestive failure. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9 (suppl. 3): S82-S88, 1987.

PRODUCT DESK REFERENCE. p. 691-695, 2003.

REID, J. L. Inhibitors of renin-angiotensin system: clinical pharmacology studies on kinetics, dynamics and concentration-effect relationships. **Arzneimittelforschung**, 43: 263-4, 1993.

REYDEL-BAX, P.; REDALIEU, E.; RAKLIT, A. Direct determination of angiotensin of angiotensin-converting enzyme inhibitors in plasma by radioenzymatic assay. **Clin Chem**, 33: 549-553, 1987.

RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M. N.; MARTINS, A. R.; MORENO, H.; MENDES, G. B.; NUCCI, G. Bioequivalence study of two enalapril maleate tablet formulations in healthy male volunteers. **Pharmacokinetics and Disposition**, 50: 399-405, 1996.

RUSH, J.E.; MERRILL, D.D. The safety and tolerability of lisinopril in clinical trials. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9(3): S99-S107, 1987.

SHEINER, L. B. Bioequivalence revisited. **Stat Med**, 11: 1777-1788, 1992.

SHEPHARD, N. Partial non-gaussian state space. **Biometrika**, 81(1): 115-131, 1994.

SHUMAKER, R.C. PKCAL: a BASIC interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. **Drug Metab Rev**, 17: 331-348, 1986.

SONG, J. C.; WHITE, C. M. Clinical pharmacokinetics and selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors. **Clin Pharmacokinet**, 41 (3): 207-224, 2002.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica e fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. [S.n.: s.L.], 1999. 78p.

SWAISLAND, A. J. The pharmacokinetics of co-administered lisinopril and hydrochlorothiazide. **J Hum Hypertens**, 5(20): 69-71, 1991.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: the complete drug reference**. 33.ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. p.921

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS
EVALUATION OF MEDICINES FOR HUMAN USE. **Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence**. [S.n.: s.L.], 2001.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS.
Directive 65/65/EEC: investigation of bioavailability and bioequivalence. 1992.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS.
Directive 75/318/EEC: pharmacokinetic studies in man. 1987.

THE MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Rahway NJ: Merck Co, 1989. p.869.

TILL, A. E.; DICKSTEIN, K.; AARSLAND, T.; GOMEZ, H. J.; GREGG, H.; HICHENS, M.
The pharmacokinetics of lisinopril in hospitalized patients with congestive heart failure. **Br J Clin Pharmacol**, 27(2): 199-204, 1989.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Clinical pharmacokinetics**: concepts and applications. 3. ed. EUA: Williams & Wilkins, 1995. 600p

TSAKALOF, A.; BAIRACHTARI, K.; GEORGARAKIS, M. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 783(2): 425-432, 2003.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Guidance for industry:** bioanalytical methods validation for human studies. CDER, 1998. Disponível em: <<http://www.delphianalytical.com/BioanalyticalMethodsVallidation.pdf>> Acesso em 12 fev. 2004.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Guidance for industry:** Bioavalability and bioequivalence studis for orally administered drug products: general considerations. CDER, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>> Acesso em 12 fev. 2004.

ULM, E. H.; HICHENS, M.; GOMEZ, H.J.; TILL, A. E.; HAND, E.; BIOLLAZ, J. et al. Enalapril maleate and a lysine analogue (MK-521): disposition in man. **Br J Clin Pharmacol**, 14: 357-362, 1982.

US pharmacopeia dispensing information (USP DI). 12.ed. [S. n.: S. L.], 1992. vol. I, p. 254.

VANDENBURG, M. J.; MORRIS, F.; MARKS, C.; KELLY, J. G.; DEWS, I. M.; STEPHENS, J. D. A study of the potencial pharmacokinetic interaction of lisinopril and digoxin in normal volunteers. **Xenobiotica**, 18(10): 1179-1184, 1988.

WESTLAKE, W. J. Statistical aspects comparative bioavallability trials. **Biometrics**, 35: 273-280, 1979.

WESTLAKE, W. J. Symmetrical Intervals for bioequivalence Trials. **Biometrics**, 32: 741-744, 1976.

WILKINSON, G. R. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 3-29.

WILSON, K. Sex-related differences in drug disposition in man. **Clin Pharmacokinet**, 9: 189-203, 1984.

WITTE, P. U.; IRMISCH, R. ; HAJDU, P. ; METZGER, H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel orally active angiotensin converting enzyme inhibitor (HOE 498) in healthy subjects. **Eur J Clin Pharmacol**, 27(5): 577-581, 1984.

WONG, Y. C.; CHARLES, B. G. Determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in urine using solid phase extration and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Appl**, 673(2): 306-310, 1995.

WORLAND P. J.; JARROT B. Radioimmunoassay for the quantification of lisinopril and enalaprilat. **J Pharm Sc**, 75: 512-516, 1986.

YAN, A. S.; GILBERT, J. D. Time-resolved fluoroimmunoassay for the determination of lisinopril and enalaprilat in human serum. **J Pharm Biomed Anal**, 14: 773-781, 1996.

Anexo



Estudo de Biodisponibilidade de uma Formulação de Lisinopril comprimido de 20 mg da Medley S.A. Indústria Farmacêutica versus uma Formulação de Lisinopril comprimido de 20 mg do Produto de Referência da Astra Zeneca (Zestril®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos
GDN 63/01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Responsáveis: Drs Gilberto de Nucci, Eduardo Abib Junior, Moisés L P Vanuncci e Ronilson Agnaldo Moreno.

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos/pesquisadores Clínicos Gilberto de Nucci, Eduardo Abib Jr, Moisés Luis Pirasol Vanunci e Ronilson Agnaldo Moreno, da Unidade Analítica Cartesius/Unidade Miguel Servet.

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se comprimido de Lisinopril (20mg) produzido pela Medley S.A Indústrias Farmacêuticas. - *Formulação Teste* - atingem níveis no sangue equivalentes ao Zestril® da Astra Zeneca.- *Formulação Referência*. Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir ao Hospital para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo ; bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicérides); exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e

HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré estudo.

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 24 horas cada período, com intervalo mínimo de 15 dias. Em cada internamento, a) será administrado um comprimido de Lisinopril, acompanhado de 200mL de água sem gás; b) serão coletadas 40 amostras de sangue de 6 mL, cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 25 mL antes da administração da medicação para o controle do método. c) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; d) serão também servidas refeições padronizadas (jantar, na noite da internação; almoço, lanche da tarde e jantar, ceia no dia de administração do medicamento) ou bebidas em horários preestabelecidos. Um total de 350 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 30 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo; c) não pode tomar bebidas contendo cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta.

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 8 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade 2 vez em cada internação para a coleta da amostra de sangue após a alta de cada uma das internações, no horário indicado pela equipe, relativo à coleta de 24 e 48 horas após a medicação; f) retornar à Unidade na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para participação no ensaio clínico que não estejam grávidas, comprovado por exame de gravidez (Beta-HCG). Não é permitida a participação se vier a ficar grávida após o exame, se estiver amamentando, ou se estiver pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo.

Caso, mesmo tendo considerado estas precauções, vier a suspeitar que engravidou durante a participação no estudo, deverá comunicar imediatamente o fato à equipe e deverá interromper sua participação.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração por boca de Lisinopril de maneira continuada pode causar reações como náuseas, dor de cabeça,, lesões de pele avermelhadas, fraqueza, diarreia, vômitos, tosse, falta de ar, impotência, queda de pressão, alterações do ritmo do coração, batadeira, zumbido no ouvido.

Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Lisinopril tem menor probabilidade de aparecer.

Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que freqüentemente resolve sem maiores problemas.

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A participação neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento nesta Instituição, sem qualquer custo. Não haverá no entanto qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Executivos Seguros (Sul America Aetna)

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 340.00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta.

Caso desista ou seja dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que durante o período de sua participação no Estudo vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até o Hospital das Clínicas –

Unicamp para internação ou realização dos exames e consultas, bem como coletas de amostras após a alta,. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico deste Hospital.

Obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico. Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida, em função a) da ocorrência de eventos adversos; b) da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo; c) do não cumprimento das normas estabelecidas; d) de qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem estar ou dos demais participantes; e) da suspensão do Estudo como um todo. A Unidade Analítica Cartesius/Miguel Servet o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade Analítica Cartesius/Miguel Servet.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. A Unidade Analítica Cartesius/Miguel Servet não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos. Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, deverão procurar a Unidade Analítica Cartesius (Fone 3818-7493) e solicitar que a mesma contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contactar o Dr. Gilberto de Nucci para receber informações adicionais, relacionadas Pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contactar a Secretaria do Comitê de ética em Pesquisas da Unicamp pelo telefone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Campinas _____ de _____

Assinatura do Voluntário

Número do Voluntário

Nome do Voluntário

Data

Telefones

Data Assinatura

Dr. Gilberto de Nucci (19) 9792 4032; (19) 3251-6928 _____

Dr. Eduardo Abib Jr (19)9792-2913; (19) 3253-6164 _____

Dr. Ronilson A.Moreno (19)9773-8489; (19) 3272-0026 _____



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
☐ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 11/12/01
(Grupo II)

PARECER PROJETO: Nº 269/2001

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE DE UMA FORMULAÇÃO DE LISINOPRIL COMPRIMIDO DE 20MG DA MEDLEY S.A. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, (FORMULAÇÃO TESTE) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE LISINOPRIL COMPRIMIDO DE 20MG DO PRODUTO REFERÊNCIA DA ASTRA ZENECA ZESTRIL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 19/10/2001

II - OBJETIVOS

Avaliação de biodisponibilidade da droga teste Lisinopril, substância derivada do enaprilato (metabólito ativo do enalapril), antagonista competitivo da enzima conversora de angiotensina (ECA) produzida pelo laboratório Medley contra formulação da mesma droga na mesma dosagem de 20 mg produzida pelo laboratório Astra Zeneca, em voluntários sadios, seguindo protocolo de ensaio clínico aleatorizado cruzado usando dois períodos sequenciais de administração das drogas no mesmo indivíduo, sendo estudados parâmetros de farmacocinética

III - SUMÁRIO

Estudo prospectivo de tipo ensaio clínico terapêutico, aleatorizado, cruzado, no qual o indivíduo, utilizando a droga teste será seu próprio controle usando droga referência em períodos subsequentes.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Protocolo bem estruturado e detalhado contemplando aspectos essenciais de desenvolvimento desse tipo de ensaio clínico.

Os riscos desse tipo de estudo usando drogas já testadas em ensaios clínicos randomizados em grandes amostras populacionais é bastante relativizado usando-se doses mínimas terapêuticas. Efeitos colaterais são conhecidos e previsíveis.

Não há possibilidade de retorno individual imediato a partir dos resultados obtidos

A metodologia descrita se adequa aos objetivos propostos

O autor apresenta orçamento detalhado dos estudo contemplando valor a ser recebido pelos voluntários, referente a pagamento de despesas de transporte e tempo despendido durante o estudo, no valor de 340 reais.

CONCLUSÃO: APROVADO.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP; após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.


Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 11 de dezembro de 2001.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

LISTA DE RANDOMIZAÇÃO

Voluntário	Período	
	1	2
I	T	R
II	R	T
III	T	R
IV	R	T
V	T	R
VI	R	T
VII	R	T
VIII	T	R
IX	R	T
X	T	R
XI	T	R
XII	R	T
XIII	R	T
XIV	T	R
XV	R	T
XVI	T	R
XVII	R	T
XVIII	R	T
XIX	T	R
XX	T	R
XXI	R	T
XXII	T	R
XXIII	R	T
XXIV	T	R
XXV	T	R
XXVI	R	T

Apendice

I

Tabela 5: concentrações plasmáticas individuais do medicamento de referência Zestril® ng/ml)

Tempo de coleta (h)	Voluntário																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	1	3	3	3	3	2	2	3	16	6	3	3	31	3	5	4	35	0	5	9	7	28	5	15	12	14
2.0	31	16	13	9	43	9	18	13	73	48	5	11	79	5	54	37	85	31	22	54	27	97	25	52	52	64
3.0	62	43	32	30	74	20	50	30	113	70	18	28	139	11	83	68	110	75	42	79	42	124	54	84	97	103
3.5	75	61	53	36	79	25	68	40	138	100	23	29	133	13	99	73	127	101	47	78	47	157	66	90	104	117
4.0	94	67	61	48	77	24	72	49	143	100	25	32	157	17	112	90	133	123	51	85	49	182	86	103	114	121
4.5	110	72	62	55	97	29	68	48	158	108	29	35	157	20	153	103	125	143	58	95	51	168	93	118	114	120
5.0	127	82	83	63	102	27	84	54	153	131	30	41	164	21	129	103	130	127	68	99	46	175	103	129	119	124
5.5	132	81	87	66	105	33	92	61	150	105	33	29	174	22	132	125	122	157	75	77	52	152	104	112	123	123
6.0	124	87	88	62	102	31	94	60	156	117	30	34	149	23	118	118	113	142	78	82	52	167	102	121	126	121
6.5	114	88	93	66	105	31	110	62	142	122	33	29	157	19	114	124	99	152	78	81	49	169	101	108	118	110
7.0	118	84	88	72	119	32	102	61	81	132	34	32	154	23	104	126	109	127	79	82	49	149	101	114	106	103
7.5	115	75	85	72	96	33	109	53	58	129	34	31	156	21	104	145	95	137	88	76	45	164	96	109	122	96
8.0	108	72	89	68	94	31	113	58	92	121	33	30	159	23	101	128	88	125	79	60	45	129	93	101	104	92
8.5	105	72	90	62	83	29	130	54	100	119	31	32	166	21	107	119	92	119	85	68	44	141	81	98	110	85
9.0	91	69	87	63	95	28	114	63	134	134	28	31	135	20	94	101	80	113	84	56	45	116	86	95	89	72
10.0	76	61	77	63	76	28	88	46	116	116	27	26	135	15	67	106	70	102	66	45	37	107	77	85	87	69
12.0	58	54	67	51	65	27	66	37	113	92	23	20	91	8	50	70	54	81	58	40	28	84	60	59	68	47
24.0	10	13	17	13	15	7	26	8	14	26	8	5	24	3	8	21	9	14	13	10	7	17	10	12	18	10
48.0	2	2	3	3	3	0	4	0	4	3	3	3	3	3	0	3	2	3	3	3	2	3	3	3	0	3

Tabela 6: Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento de referência (R) nos 26 voluntários

Tempos de coleta	Média	Mediana	Desvio Padrão	Covariância	Mínimo	Máximo	Amplitude
0.0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	9	5	9	90	0	35	35
2.0	37	31	27	706	5	97	92
3.0	65	65	35	1232	11	139	128
3.5	76	74	39	1510	13	157	144
4.0	85	86	43	1849	17	182	165
4.5	92	96	44	1953	20	168	148
5.0	97	103	43	1858	21	175	154
5.5	97	105	42	1799	22	174	152
6.0	96	102	41	1643	23	167	144
6.5	95	103	41	1641	19	169	150
7.0	92	102	36	1316	23	154	131
7.5	90	96	40	1564	21	164	143
8.0	86	92	35	1221	23	159	136
8.5	86	88	37	1349	21	166	145
9.0	82	87	33	1108	20	135	115
10.0	72	73	31	963	15	135	120
12.0	57	58	24	597	8	113	105
24.0	13	13	6	38	3	26	23
48.0	2	3	1	1	0	4	4

Tabela 7: Concentrações plasmáticas individuais do medicamento teste Lisinopril (ng/ml)

Tempo de coleta (h)	Voluntário																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
0.0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	10	5	0	0	4	5	0	0	19	3	3	9	31	2	4	5	6	4	3	11	8	27	5	2	5	9
2.0	77	28	2	5	40	13	3	11	76	31	5	29	83	12	18	23	32	31	18	45	24	91	22	20	26	44
3.0	129	50	5	18	75	21	22	38	109	63	17	42	93	31	34	51	45	86	36	75	39	130	37	61	56	80
3.5	154	69	9	30	78	18	45	52	138	71	24	44	111	43	41	57	59	100	47	85	41	152	50	80	81	86
4.0	148	70	19	46	78	20	58	67	159	103	27	44	115	49	59	61	62	101	54	86	45	167	57	100	92	91
4.5	165	86	29	54	84	22	67	78	161	106	35	52	112	55	63	70	51	113	65	89	49	153	72	109	99	92
5.0	184	85	31	64	85	28	74	78	147	115	32	50	128	67	85	77	61	117	67	80	50	151	72	121	100	96
5.5	174	88	44	64	85	29	85	86	153	112	32	49	138	65	92	77	63	116	65	88	47	164	76	136	103	90
6.0	169	94	45	70	68	32	85	79	169	109	39	51	120	76	91	79	66	134	69	81	44	145	95	135	108	88
6.5	167	91	49	71	82	28	81	87	174	114	32	48	118	60	87	81	59	114	73	92	48	150	79	133	84	88
7.0	166	86	46	70	37	28	74	84	133	122	32	48	117	63	89	78	62	136	68	76	37	150	83	121	96	72
7.5	152	91	45	69	75	29	85	75	129	118	32	44	110	48	85	80	45	102	77	88	43	130	79	119	91	80
8.0	143	81	48	67	72	25	78	78	181	113	35	44	110	55	80	83	49	102	69	70	35	137	73	119	88	74
8.5	134	80	46	65	56	28	89	79	114	102	35	44	124	53	69	67	55	104	69	71	37	133	73	131	87	70
9.0	116	79	47	63	37	16	70	71	101	106	31	38	92	52	84	65	44	86	64	68	33	127	77	130	80	66
10.0	98	68	44	58	60	26	82	64	87	88	28	35	94	44	62	57	38	77	61	61	31	106	60	107	79	54
12.0	77	52	38	54	54	19	64	54	59	74	26	22	76	33	54	51	32	67	56	49	25	65	47	92	64	46
24.0	14	13	8	12	13	6	19	10	12	26	8	9	18	9	10	10	7	11	14	11	7	16	12	18	14	9
48.0	3	3	0	4	2	2	5	2	2	4	2	3	3	3	2	3	3	3	4	2	2	3	2	2	3	3

Tabela 8: Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento teste (T) nos 26 voluntários

Tempos de coleta	Média	Mediana	Desvio Padrão	Covariância	Mínimo	Máximo	Amplitude
0.0	0	0	0	0	0	2	2
1.0	7	5	8	60	0	31	31
2.0	31	25	25	626	2	91	89
3.0	56	48	34	1122	5	130	125
3.5	68	58	38	1481	9	154	145
4.0	76	65	39	1551	19	167	148
4.5	82	75	38	1440	22	165	143
5.0	86	79	38	1475	28	184	156
5.5	89	86	39	1523	29	174	145
6.0	90	83	38	1407	32	169	137
6.5	88	83	38	1424	28	174	146
7.0	84	77	37	1399	28	166	138
7.5	82	80	32	1038	29	152	123
8.0	81	76	36	1319	25	181	156
8.5	78	71	31	971	28	134	106
9.0	71	69	30	878	16	130	114
10.0	64	61	24	556	26	107	81
12.0	52	54	18	339	19	92	73
24.0	12	12	4	20	6	26	20
48.0	3	3	1	1	0	5	5

Tabela 9: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos no medicamento de referência (R)

Indivíduo	Período	Sequência	Tmax	Cmax	Ke	t1/2	ASCt	ASCInf
1	2	TR	5,5	132	0,10	6,7	1375	1394
2	1	RT	6,5	88	0,09	7,5	1155	1177
3	2	TR	6,5	93	0,09	8,1	1358	1393
4	1	RT	7,0	72	0,08	8,6	1059	1096
5	2	TR	7,0	119	0,09	7,8	1468	1502
6	1	RT	5,5	33	0,10	6,7	456	524
7	1	RT	8,5	130	0,08	8,9	1658	1709
8	2	TR	9,0	63	0,13	5,5	718	782
9	1	RT	4,5	158	0,09	7,6	2004	2048
10	2	TR	9,0	134	0,10	7,2	1996	2028
11	2	TR	7,0	34	0,06	11,3	566	615
12	1	RT	5,0	41	0,06	10,9	517	565
13	1	RT	5,5	174	0,09	7,4	2314	2346
14	2	TR	6,0	23	0,06	12,6	305	360
15	1	RT	4,5	153	0,15	4,6	1252	1304
16	2	TR	7,5	145	0,09	8,0	1731	1766
17	1	RT	4,0	133	0,10	6,8	1450	1470
18	1	RT	5,5	157	0,10	7,1	1761	1791
19	2	TR	7,5	88	0,09	8,1	1196	1231
20	2	TR	5,0	99	0,08	8,3	1112	1148
21	1	RT	5,5	52	0,08	8,5	724	749
22	2	TR	4,0	182	0,10	7,0	2121	2151
23	1	RT	5,5	104	0,09	7,7	1297	1330
24	2	TR	5,0	129	0,09	7,5	1497	1530
25	2	TR	6,0	126	0,11	6,2	1482	1643
26	1	RT	5,0	124	0,09	7,6	1391	1423
Média	-	-	6,1	107	0	8	1306	1349
DP (%)	-	-	1,4	45,6	0,0	1,7	529,1	525,2

Tabela 10: Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento referência (R)

Medida farmacocinética	Média	Mediana	Desvio Padrão	Variância	Mínimo	Máximo	Amplitude
Tmax (h)	6,1	5,5	1,4	2,0	4,0	9,0	5,0
Cmax (ng/ml)	107,2	121,5	45,6	2080,2	23,0	182,0	159,0
Ke (1/h)	0,09	0,09	0,20	0,00	0,06	0,15	0,09
T1/2 (h)	7,9	7,6	1,7	2,8	4,6	12,6	8,0
ASC ₀₋₁ (ng/ml*h)	1306,3	1366,5	529,1	279996,2	305,0	2314,0	2009,0
ASCinf (ng/ml*h)	1349,0	1393,5	525,2	275853,7	360,0	2346,0	1986,0

Tabela 11: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos no medicamento teste (T)

Indivíduo	Período	Sequência	Tmax	Cmax	Ke	t1/2	ASct	ASCInf
1	2	TR	5,0	184	0,10	6,9	1986	2016
2	1	RT	6,0	94	0,09	8,1	1246	1280
3	2	TR	6,5	49	0,12	5,6	581	646
4	1	RT	6,5	71	0,07	9,4	1052	1106
5	2	TR	5,0	85	0,09	7,7	1154	1176
6	1	RT	6,0	32	0,07	10,4	469	499
7	1	RT	8,5	89	0,07	9,6	1365	1434
8	2	TR	6,5	87	0,09	7,4	1096	1117
9	1	RT	8,0	181	0,10	6,8	1756	1775
10	2	TR	7,0	122	0,08	8,5	1791	1840
11	2	TR	6,0	39	0,07	9,6	576	604
12	1	RT	4,5	52	0,05	12,8	736	792
13	1	RT	5,5	138	0,09	7,5	1804	1837
14	2	TR	6,0	76	0,08	9,0	844	883
15	1	RT	5,5	92	0,10	7,2	1109	1130
16	2	TR	8,0	83	0,08	8,3	1098	1133
17	1	RT	6,0	66	0,08	9,0	820	859
18	1	RT	7,0	136	0,09	7,4	1485	1517
19	2	TR	7,5	77	0,07	9,4	1160	1214
20	2	TR	6,5	92	0,09	7,4	1188	1209
21	1	RT	5,0	50	0,08	8,9	660	686
22	2	TR	4,0	167	0,10	7,1	1953	1983
23	1	RT	6,0	95	0,09	7,4	1095	1116
24	2	TR	5,5	136	0,11	6,5	1788	1807
25	2	TR	6,0	108	0,09	8,0	1395	1430
26	1	RT	5,0	96	0,09	8,1	1156	1191
Média	-	-	6,1	96	0	8	1206	1242
DP (%)	-	-	1,1	41,1	0,0	1,5	440,7	438,0

Tabela 12: Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento teste (T)

Medida farmacocinética	Média	Mediana	Desvio Padrão	Variância	Mínimo	Máximo	Amplitude
Tmax (h)	6,1	6,0	1,1	1,2	4,0	8,5	4,5
Cmax (ng/ml)	96,0	90,5	41,1	1685,7	32,0	184,0	152,0
Ke (1/h)	0,09	0,09	0,01	0,00	0,05	0,12	0,07
T1/2 (h)	8,2	8,1	1,5	2,1	5,6	12,8	7,2
ASC _{0-t} (ng/ml*h)	1206,3	1155,0	440,7	194180,3	469,0	1986,0	1571,0
ASCinf (ng/ml*h)	1241,5	1183,5	438,0	191885,5	499,0	2016,0	1517,0

Tabela 13: Razão das áreas ASC_{0-t} e ASC_{inf} para o medicamento referência

Voluntário	ASC_t	ASC_{inf}	ASC_t/ASC_{inf}
1	1375	1394	98,64
2	1155	1177	98,13
3	1358	1393	97,49
4	1059	1096	96,62
5	1468	1502	97,74
6	456	524	87,02
7	1658	1709	97,02
8	718	782	91,82
9	2004	2048	97,85
10	1996	2028	98,42
11	566	615	92,03
12	517	565	91,50
13	2314	2346	98,64
14	305	360	84,72
15	1252	1304	96,01
16	1731	1766	98,02
17	1450	1470	98,64
18	1761	1791	98,32
19	1196	1231	97,16
20	1112	1148	96,86
21	724	749	96,66
22	2121	2151	98,61
23	1297	1330	97,52
24	1497	1530	97,84
25	1482	1643	90,20
26	1391	1423	97,75
Média	1306	1349	96,83

Tabela 14: Razão das áreas ASC_{0-1} e ASC_{inf} para o medicamento teste

Voluntário	ASCt	ASCinf	ASCt/ASCinf
1	1986	2016	98,51
2	1246	1280	97,34
3	581	646	89,94
4	1052	1106	95,12
5	1154	1176	98,13
6	469	499	93,99
7	1365	1434	95,19
8	1096	1117	98,12
9	1756	1775	98,93
10	1791	1840	97,34
11	576	604	95,36
12	736	792	92,93
13	1804	1837	98,20
14	844	883	95,58
15	1109	1130	98,14
16	1098	1133	96,91
17	820	859	95,46
18	1485	1517	97,89
19	1160	1214	95,55
20	1188	1209	98,26
21	660	686	96,21
22	1953	1983	98,49
23	1095	1116	98,12
24	1788	1807	98,95
25	1395	1430	97,55
26	1156	1191	97,06
Média	1206	1242	97,16

Lisinopril quantification in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry

Ana A. F. Padua¹, Rafael E. Barrientos-Astigarraga², Vinicius M. Rezende², Gustavo D. Mendes² & Gilberto De Nucci^{12*}

Running title: Determination of Lisinopril in human plasma

Keywords: LC-MS/MS, ACE inhibitor, enalaprilat, SPE

¹ Department of Pharmacology, State University of Campinas, PO Box 6111 Campinas/SP, Brazil

² Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology ICB-USP, Av. Prof Lineu Prestes, 1524, 05508-900 Sao Paulo/SP, Brazil

* **Author for correspondence:** 415 Jesuino Marcondes Machado Ave - 13092-320, Campinas - SP, Brazil. - Phone: + 55 19 32516928 - Fax number: + 55 19 32521516 - E-mail: denucci@dglnet.com.br

Abstract

An analytical method based on liquid chromatography with positive ion electrospray ionization (ESI) coupled to tandem mass spectrometry detection was developed for the determination of lisinopril in human plasma using enalaprilat as internal standard. The analyte and internal standard were extracted from the plasma samples by solid-phase extraction using Waters HLB Oasis[®] SPE cartridges and chromatographed on a C₈ analytical column. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (60:40 v/v) + 20 mM acetic acid + 4.3 mM of triethylamine. The method had a chromatographic total run time of 6.5 min and was linear within the range 2.00 – 200 ng/ml. Detection was carried out on a Micromass triple quadrupole tandem mass spectrometer by Multiple Reaction Monitoring (MRM). The precision (CV %) and accuracy, calculated from limit of quantification (LOQ) samples (n=8), were 8.9 % and 98.9 %, respectively. The method herein described was employed in a bioequivalence study of two tablet formulations of lisinopril 20 mg.

1. Introduction

Lisinopril, (N-[1-carboxy-3-phenylpropyl-L-lysyl]proline), the third ACE inhibitor approved for use in the United States, is the lysine analog of enalaprilat. Unlike enalapril, lisinopril itself is active [1]. It has been demonstrated to be effective in the treatment of heart failure, hypertension and acute myocardial infarction [2].

Lisinopril has been measured by several techniques, such as bioassay (through inhibition of ACE [3]), radioimmunoassay [4 - 8], fluoroimmunoassay [9].

Recently, an assay based on gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC-MS) [10,11] and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) [12] were described. Both methods were successfully applied to the measurements of lisinopril in human plasma/serum.

Here we present a fast, sensitive and selective method for measuring plasma lisinopril using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). This method was applied to a bioequivalence study in healthy volunteers.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Lisinopril was provided by EMS, Brazil, lot number 00109987. Enalaprilat was obtained from United States Pharmacopeia (USP), lot number I. Waters Oasis® HLB cartridges (30 mg, 1 cc) for solid phase extraction was purchased from Waters Co. (Milford, MA, USA). Acetonitrile and methanol (HPLC-grade), fuming hydrochloric acid (37%) and glacial acetic acid (analysis grade) were purchased from Mallinckrodt (Paris, ST, USA). Ultra pure water was obtained from an Elga UHQ system (Elga, UK). Blank human blood was collected from healthy, drug-free volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of blood treated with the anticoagulant sodium heparin. Pooled plasma was prepared and stored at approximately – 20 °C until needed.

2.2. Calibration standards and quality control

Stock solutions of lisinopril and internal standard (enalaprilat) were prepared in methanol-water (50:50 v/v) at concentrations of 1 mg/mL. Calibration curves of lisinopril were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100 and 200 ng/mL and the analysis was carried out in duplicate for each concentration. The quality control samples were prepared in blank plasma at concentrations of 6.00, 30.0 and 150 ng/mL (QCA, QCB, and QCC, respectively). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted on each analytical batch along with the unknown samples.

2.3. Sample preparation

All frozen human plasma samples were previously thawed at ambient temperature and centrifuged at 2,550 g for 5 min at 4 °C to precipitate solids. Four hundred microliters of aqueous hydrochloric acid solution (10 mM) were dispensed into appropriate glass tubes and then five hundred microliters of sample human plasma was added. The tubes were briefly vortex-mixed (10 s) and fifty microliters of I.S. (2.0 µg/mL Enalaprilat in aqueous solution) were dispensed into the tubes. The tubes were briefly vortex-mixed (10 s) and stood at room temperature for 5 minutes. Sufficient previously unused Waters HLB Oasis® SPE cartridges for the assay were pre-conditioned by washing first with 2 mL methanol and then 1 mL of acetonitrile/water (80:20 v/v) + 10 mM acetic acid solution. Each wash solution was drawn through the columns under light vacuum. All of each plasma samples were applied to the individual Waters Oasis® SPE cartridges. Using light vacuum the samples were slowly drawn through the cartridges. The cartridges were washed for 5 times with 1mL of aqueous hydrochloric acid solution (10 mM). The wash was drawn through the columns under light vacuum. The Waters Oasis® SPE cartridges were placed into 12 x 120 mm appropriately numbered glass tubes. Cartridges were then eluted with 0.5 mL of methanol, which were drawn through the cartridge slowly and were collected into the glass tubes by applying a light positive pressure using an nitrogen flow. The solvent was evaporated by using a flow of nitrogen at 37 °C. This process should be conducted in a fume cupboard.

The dry residues were reconstituted with 200 microliters of acetonitrile-water (80:20; v/v) + 10 mM acetic acid solution and vortex-mixed for 15 s. The solutions were then transferred to the auto-injector microvials.

2.4. Chromatographic conditions

An aliquot (30 μ l) of each plasma extract was injected into a Genesis C₈ analytical column, (150 mm x 4.6 mm I.D.) operating at 40 °C. The compounds were eluted by pumping the mobile phase (acetonitrile/water (60:40 v/v) containing 20 mM acetic acid and 4.3 mM of triethylamine) at a flow-rate of 0.5 ml/min. Under these conditions, typical standard retention times were 4.06 min for lisinopril and 4.17 min for enalaprilat, and back-pressure values of approximately 60-100 bar were observed.

A split of the column eluant of approximately 1:10 was included so that only 50 μ l/min entered the mass spectrometer. The temperature of the auto-sampler was kept at 5 °C and the run-time was 6.5 min.

2.5. Mass-spectrometric conditions

The mass spectrometer (Micromass model Quattro II) equipped with an electrospray source using a crossflow counter electrode run in positive mode (ES+), was set up in Multiple Reaction Monitoring (MRM), monitoring the transitions 406.3 > 84.3 and 349.1 > 206.1, for lisinopril and IS, respectively. Fig. 1 shows the full scan spectra (upper trace) and the product ion spectra (lower trace) obtained for lisinopril (panel A) and enalaprilat (panel B). In Figure 2, we proposed an unusual fragmentation mechanism for the Lisinopril. Firstly, the protonated molecule (m/z 406) loss a proline residue generating the fragment m/z 263. A cyclisation is proposed secondly in order to get the unsaturated nitrogen-six-member ring (m/z 84). The proposed fragmentation route for enalaprilat is also shown in Fig. 2.

In order to optimize all the MS parameters, a standard solution of the analyte and I.S. was infused into the mass spectrometer. For both lisinopril and enalaprilat, the following optimized parameters were obtained: for lisinopril the dwell time, the cone voltage and the gas pressure (Helium) were 0.8 s, 25 V and 1.3x10⁻³mBar. For enalaprilat the dwell time, the cone voltage and the gas pressure (Helium) were 0.8 s, 20 V and 1.3x10⁻³mBar. The collision energy was 20 eV for Lisinopril and 15 eV for enalaprilat. Data

acquisition and analysis were performed using the software MassLynx (v 3.2) running under Windows NT (v 4.0) on a Digital Celebris GL 6200 PC.

2.6. Stability

Stability quality control plasma samples (3.00, 30.0 and 150 ng/mL) were subjected to short-term (6h) room temperature, three freeze/thaw (- 20 to 25 °C) cycles and long-term stability 148 days tests. For the 56h-autosampler stability (5 °C) the quality control samples used were 6.00, 30.0 and 150 ng/ml. Subsequently, the lisinopril concentrations were measured compared with freshly prepared samples. The significance of the results obtained was analyzed by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

2.7. Recovery

The recovery was evaluated by calculating the mean of the response of each concentration and dividing the extracted sample mean by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. Comparison with the unextracted samples, spiked on plasma residues, was done in order to eliminate matrix effects, giving a true recovery. The matrix effect experiments were carried out using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted samples, spiked on plasma residues.

2.8. Ionic suppression

Suppression of the MS signal ("ion suppression") can be caused by contaminants (e.g. salts) in the LC eluant entering the MS. Thus, a non-specific extraction procedure may produce ion suppression that could interfere with the analysis of the samples. The effects of the sample preparation method (for the matrix that is being analyzed) on the variability of the electrospray ionization response should be determined.

To assess the effect of ion suppression on the MS/MS signal of the analyte, Lisinopril, and the internal standard, Enalaprilat, the extraction procedure described in item 2.3 was evaluated. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a "zero volume tee" before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of Lisinopril, i.e.

acetonitrile/water (60:40 v/v) + 20 mM acetic acid + 4.3 mM of triethylamine at 0.5 mL/min. The infusion pump was set to transfer (50 μ L/min) of a mixture of analyte and internal standard in mobile phase (both 50 μ g/mL). A sample of human pooled blank plasma was extracted by the extraction procedure. The reconstituted extract was injected into the HPLC system while the standard mixture was being infused. In this system any ion suppression would be observed as a depression of the MS signal.

2.9. Bioequivalence Study

The method was applied to evaluate the bioequivalence of two tablet formulations of lisinopril 20 mg in healthy volunteers: Lisinopril (test formulation from Medley S/A Indústria Farmacêutica, Brazil; lot N° LIC 06/01-1, expiry date June 2003) and Zestril® (standard reference formulation from Astra Zeneca; lot N° A03534, expiry date October 2004).

Twenty-six healthy volunteers of both sexes were selected for the study. The study was a single dose, two-way randomized crossover design with a 2-week washout period between the doses. Blood samples were collected before and 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10, 12, 24 and 48 h post-dosing.

The bioequivalence between the two formulations was assessed according to US-FDA methodology [13].

3. Results

As show in Fig. 3, no endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma. The chromatogram for the standard LOQ sample is shown in Fig. 4, in which the retention times for lisinopril and I.S. were 4.06 and 4.17 min., respectively.

Linearity, precision and accuracy were determined to assess the performance of the method. A linear least-squares regression with a weighting index of $1/x$ was carried out on the peak area ratios of lisinopril and I.S. versus lisinopril concentrations of the 7 human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. The calibration curves showed good linearity within the range 2.0 – 200.0 ng/mL. Table 1 shows the between-run calibration quality report for the Quality Control samples (QC).

The recoveries observed (value \pm SD, n=5) were 79.2 ± 5.9 %, 80.3 ± 3.4 % and 82.5 ± 3.9 % (3.0 ng/mL 30.0 ng/mL and 150.0 ng/mL, respectively) for lisinopril, and 77.7 ± 7.2 % for I.S. (250 ng/mL). No significant matrix effect was observed.

The lower limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both precision and accuracy were less than or equal to 20 %, was 2.0 ng/ml.

Stability analysis was carried out with plasma quality control. All samples showed no significant degradation under the conditions previously described in the Experimental section, item 2.6.

In the case of Lisinopril and its internal standard, Enalaprilat, there was no significant ion suppression in the region where the analyte and internal standard were eluted as shown in Figure 5.

The geometric mean and respective 90 % confidence interval (CI) of Lisinopril/Zetril® percent ratios were 95.5 % (85.0 – 107.4 %) for AUC_{last}, 94.6 % (85.0 – 105.4 %) for AUC_{0-inf} and 92.6 % (81.7 – 105.1 %) for C_{max}. T_{max} was statistically analysed and the point estimate for individual differences (Lisinopril/Zetril®) was 0.06 h (90% confidence interval of – 0.4 to 0.5 h).

4. Discussion

Measurement of ACE activity as an indicator of serum concentration of ACE inhibitor has a major drawback in that the degree of enzyme inhibition does not parallel the drug levels [14]. Radioimmunoassay is a very sensitive technique (0.2 – 0.4 ng/ml), however, the antisera and/or tracers are generally not commercially available, making difficult its use for researchers. High-performance liquid chromatography methods were also described for the determination of lisinopril, but only in bulk drug analysis and for analysis of solid dosages formulations [15,16], where the drug concentrations are rather high. An assay using high-performance liquid chromatography was described and used for the measurement of lisinopril in urine [17]. However, the lower limit of quantification (LOQ) was reported to be 0.5 µg/ml, a concentration far beyond the plasma concentration found after therapeutic dosage (< 100 ng/ml). Therefore, up to now, HPLC does not meet the requirements for pharmacokinetic plasma level determinations.

This is the first report on using LC-MS/MS to quantify lisinopril in plasma. The advantages of this method is the inherent higher selectivity of tandem mass spectrometry [20] and the increased sensitivity observed (2.0 ng/ml as compared to the 6.0 ng/ml

previously reported with LC-MS [12]). The shorter retention time for both the analyte and the internal standard also allows a larger sample throughput.

After the oral administration of the lisinopril tablets to the volunteers, the observed lisinopril peak plasma concentration (C_{max}) values and the time values taken to be achieved (t_{max}) were similar to those reported in the literature [2,5,18] and equivalent between the formulations (Fig. 6). In addition, the calculated 90 % CI for mean C_{max} , AUC_{last} and AUC_{inf} Lisinopril/Zestril® individual ratios were within the 80-125% interval defined by the US Food and Drug Administration [13].

5. Conclusion

A fast and sensitive LC-MS-MS method for the quantification of lisinopril in human plasma was developed and validated. The method satisfied the requirements of high sensitivity, specificity and rapid sample throughput required for pharmacokinetic studies.

References

- [1] JACKSON, E. K.. Renin and Angiotensin. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª ed., 2002. p. 809–41.
- [2] PDR (2003) 692.
- [3] D. Saenz Campos et al. Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol. 18(8) (1996) 533.
- [4] P. J. Worland and B. Jarrot, J. Pharm. Sci. 75 (1986) 512.
- [5] Simon G. Lancaster and Peter A. Todd. Drugs 35 (1988) 646.
- [6] Erci Bellissant et al. Journal of Cardiovascular Pharmacology 28 (1996) 470.
- [7] Dennis Johnston et al..The American Journal of Cardiovascular Pharmacology. 9(Suppl. 3) (1987) S73.
- [8] M. J. Vandenburg et al. Xenobiotica, vol. 18, nº 10 (1988) 1179.
- [9] A. S. Yuan and J. D. Gilbert, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 773.
- [10] H.J. Leis, G. Fauler, G. Rasputing, W. Windischholer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (1998) 1591.
- [11] H.J. Leis, G. Rasputing, W. Windischholer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 650.
- [12] A. Tsakalof, K. Bairachtari and M. Georgarakis. Journal of Chromatography B, 783 (2003) 425.

- [13] Food and Drug Administration, Fed. Reg. 63 (1998) 64222.
- [14] W. Ribeiro et al. Eur J Clin Pharmacol 50 (1996) 399.
- [15] A. El-Gindy, A. Ashour, L. A. Abdel-Fattah and M. M. Shabana. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 25 (2001) 913.
- [16] D. Bonazzi, R. Gotti, V. Andrisano and V. Cavrini, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1997) 431.
- [17] Y. C. Wong and B.G. Charles, J. Chromatogr. B, 673 (1995) 306.
- [18] Sean C. Sweetman (Ed.), Martindale – The Complete Drug Reference, 33rd ed, Pharmaceutical Press, 2002, p.921.
- [19] Analytical Methods Validation for Human Studies. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, CDER, December 1998.
- [20] R. Kostianen; T. Kotiaho; T. Kuurane; S. Auriola J. Mass Spectrom., 38 (2003), 357-372.

Figuras

Figure 1: Full scan mass spectra in upper trace and product ion spectra in lower trace of (panel A) Lisinopril and (panel B) Enalaprilat.

Figure 2: Proposed fragmentation pathways for the Lisinopril (m/z 406) and Enalaprilat (m/z 349).

Figure 3: MRM chromatograms of blank normal human plasma: enalaprilat and lisinopril.

Figure 4: MRM chromatogram of the LOQ (2.00 ng/ml).

Figure 5: MRM chromatogram of ionic suppression test.

Figure 6: Mean plasma concentrations versus time curve for two lisinopril tablet formulations (n=26).

Tabela

Table 1: Data for quantified concentration (ng/ml) of individual QC samples for intra-batch and inte-batch validation.

Figure 1

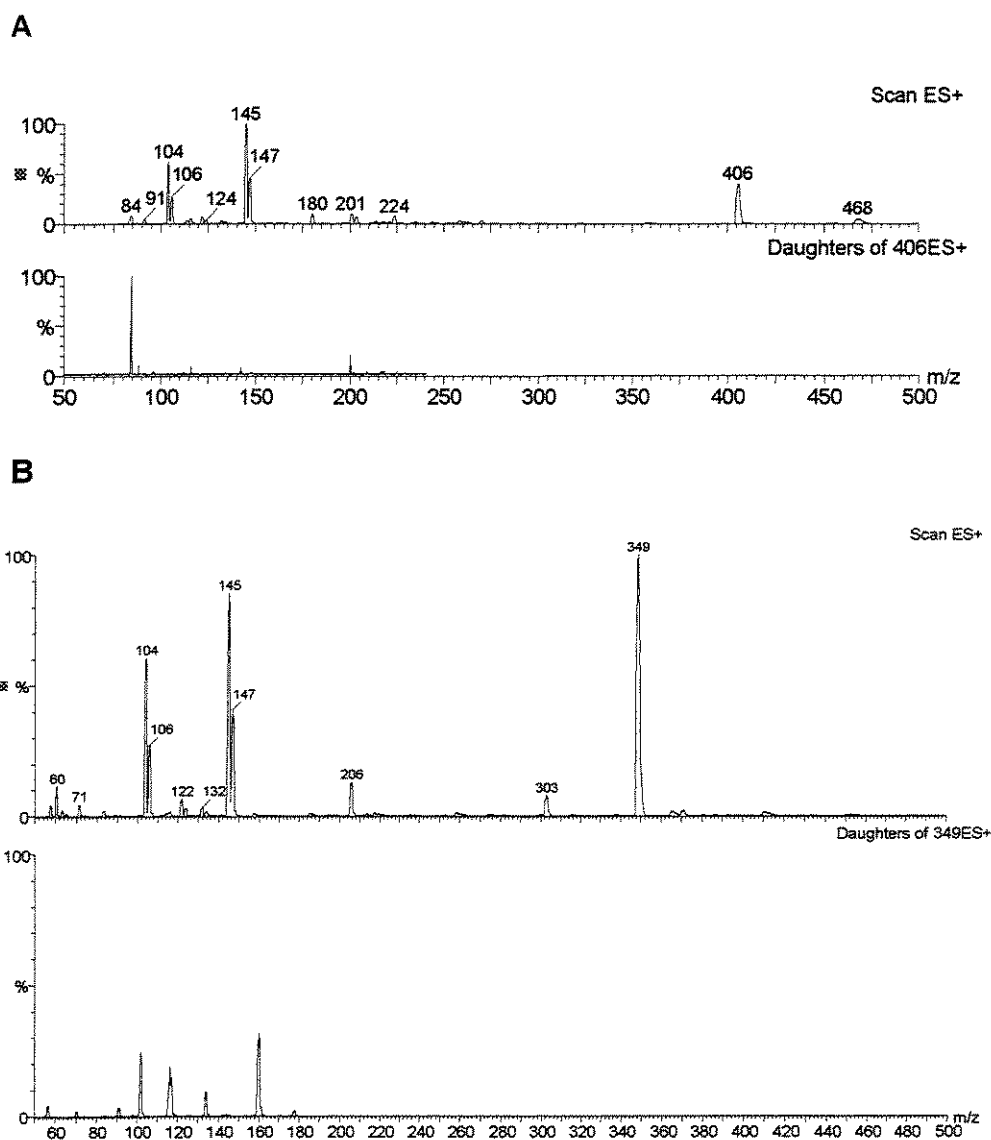


Fig. 1. Full scan mass spectra in upper trace and product ion spectra in lower trace of (panel A) Lisinopril and (panel B) Enalaprilat

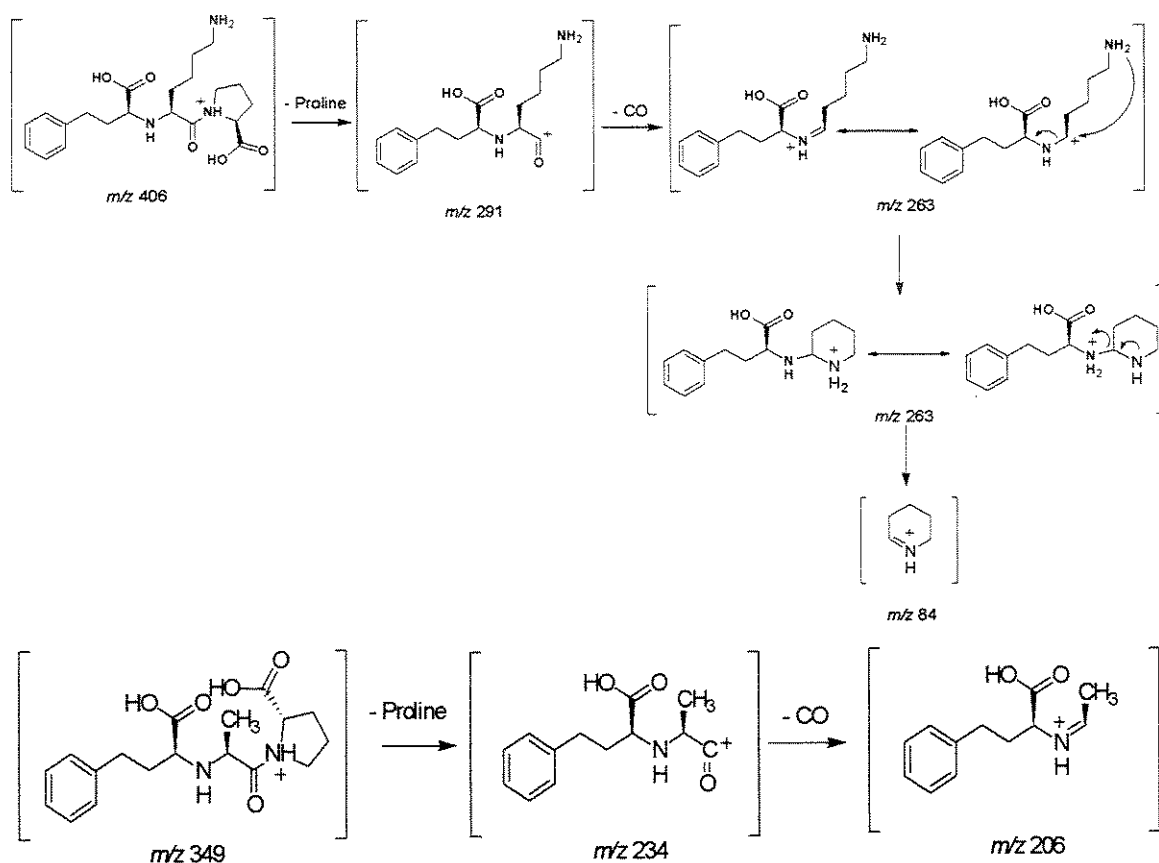


Fig. 2. Proposed fragmentation pathways for the Lisinopril (m/z 406) and Enalaprilat (m/z 349).

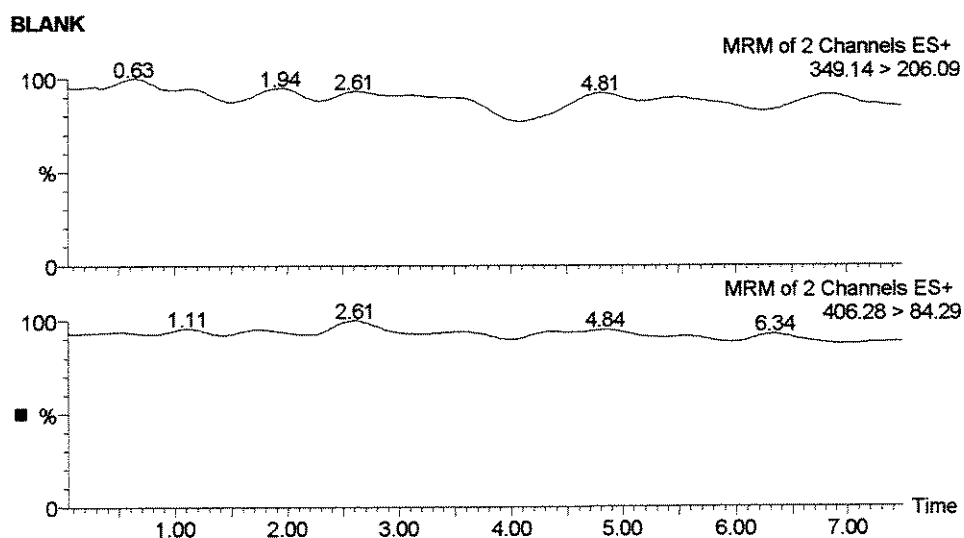


Fig. 3. MRM chromatograms of blank normal human plasma: enalaprilat and lisinopril.

Figure 4

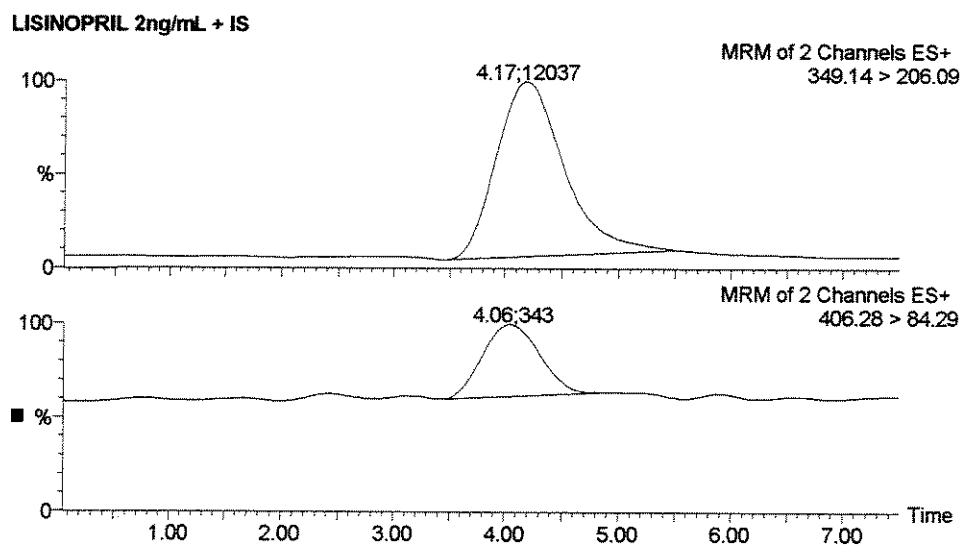


Fig. 4. MRM chromatogram of the LOQ (2ng/ml).

Figure 5

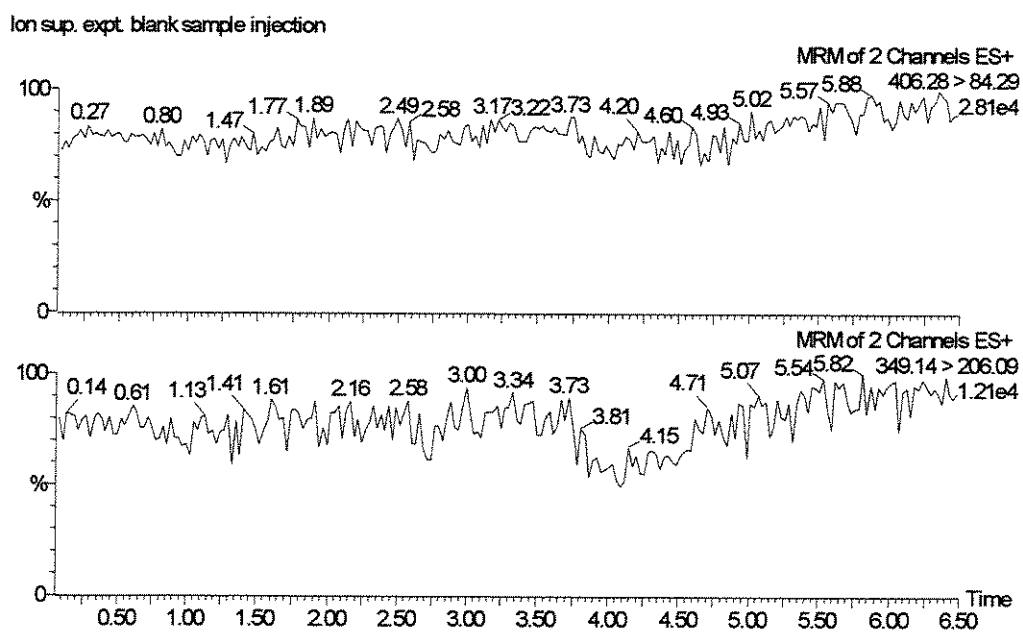


Fig. 5. MRM chromatogram of ionic suppression test

Figure 6

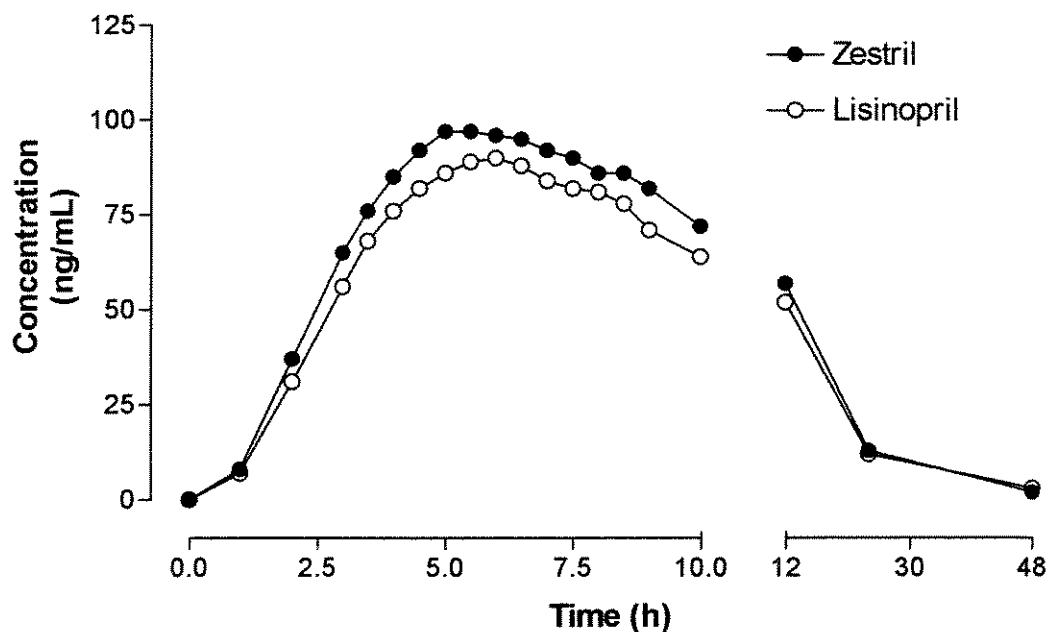


Fig. 6. Mean plasma concentrations versus time curve for two lisinopril tablet formulations (n=26).

Table 1

Data for quantified concentration (ng/ml) of individual QC samples for intra-batch and inter-batch validation

	Nominal concentration (ng/ml)		
	6 ng/ml	30 ng/ml	150 ng/ml
<i>Intra-batch (n=8)</i>			
Accuracy (%)	99.7	95.0	109.1
Precision (%)	6.2	8.2	7.2
<i>Inter-batch (n=3)</i>			
Accuracy (%)	94.3	94.0	98.6
Precision (%)	5.0	4.9	10.0